

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

**AMAURY FREIRE DE LIMA JUNIOR**

**BIODEGRADAÇÃO E ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM  
RESÍDUOS OLEOSOS DERIVADOS DO  
SANEAMENTO AMBIENTAL**

VITÓRIA  
2009

**AMAURY FREIRE DE LIMA JUNIOR**

**BIODEGRADAÇÃO E ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM  
RESÍDUOS OLEOSOS DERIVADOS DO  
SANEAMENTO AMBIENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini.

Co-orientadora: Dr. Junko Tsukamoto

VITÓRIA

2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

L732b Lima Junior, Amaury Freire de, 1982-  
Biodegradação e atividade lipolítica em resíduos oleosos  
derivados do saneamento ambiental / Amaury Freire de Lima  
Junior. – 2009.  
120 f. : il.

Orientador: Sérgio Túlio Alves Cassini.  
Co-Orientadora: Junko Tsukamoto.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito  
Santo, Centro Tecnológico.

1. Bactérias - Isolamento. 2. Lipase. 3. Análise enzimática. 4.  
Resíduos. 5. Saneamento. 6. Biodegradação. 7. Meio ambiente.  
I. Cassini, Sérgio Túlio Alves. II. Tsukamoto, Junko. III.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Tecnológico. IV.  
Título.

CDU: 628

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

**“Biodegradação e atividade lipolítica em  
resíduos oleosos derivados do saneamento  
ambiental”.**

**AMAURY FREIRE DE LIMA JUNIOR**

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini  
Orientador – DEA/CT/UFES

Dra. Junko Tsukamoto  
Co-Orientadora – PPGEA/CT/UFES

Profa. Dra. Regina de Pinho Keller  
Examinadora Interna - DEA/CT/UFES

Prof. Dr. Arnaldo Antônio Rodella  
Examinador Externo – USP-ESALQ

Coordenador do PPGEA: Prof. Dr. Julio Tomás Aquije Chacaltana

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
Vitória, ES, 22 de Maio de 2009.

À minha família pelo amor, apoio  
e incentivo.

## *Agradecimentos*

A Deus por estar sempre comigo;

À minha mãe, Lourdes e aos meus Irmãos Wallace e Marcelo pelo amor e pela força, fundamentais na minha formação;

À minha namorada Gabriela, pelo carinho, paciência e compreensão;

Ao meu orientador, Professor Sérgio Túlio Alves Cassini, por sua orientação, pela oportunidade, persistência, confiança e estímulo no desenvolvimento deste trabalho;

À Co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Junko Tsukamoto, pela oportunidade, orientação, correção de inúmeros relatórios, artigos, além da dissertação;

À Banca Examinadora: Prof. Dr. Arnaldo Antonio Rodella, Prof<sup>a</sup>. Dra. Regina Keller e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Suely Gomes de Figueiredo pela disponibilidade em me avaliar;

À Carol Falcone, Livia, Weberton e Emília pelos momentos de dedicação e esforço nos experimentos nos dias da semana e nos finais de semana;

Aos amigos pesquisadores do Laboratório de Saneamento (Labsan), Pedro Cassini, Eudrades, Thaís, Caio, Eduardo Subtil, Janine, Giselle, Kamila Perin, Laila, Camila Vidal, Renata Spinassé, Patrícia Lee, Marjorye, Fernando, Deyvison, Aline Louzada, Daniel, Priscilla, Renata Itavo, Elaine, Carol Tonani, e Prof. Ricardo Franci;

Aos amigos de mestrado e doutorado: Celson, Saulo, Geovane, Valdir, Marcus Covre, Catarina, Juliana, Pedro Castro, Marcos Eugênio, Wilcler, Leandro, Paula...

Aos meus amigos Emanuel, Marcelo, Rosiane, Polyana, David, João Paulo, Georgette, Rodrigo, Simon, Ronald, Prof.<sup>a</sup> Junia Zaidan;

Ao atual coordenador do PPGEA Prof. Dr. Julio Tomás Aquije Chacaltana, pelo incentivo e pela amizade;

Ao Laboratório de Saneamento – UFES pelo suporte;

Ao Facitec e à Companhia de Desenvolvimento de Vitória (CDV), e pela bolsa de mestrado e ao CNPq pelos recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto;

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

Filipenses, 4:13

## RESUMO

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas que atuam no metabolismo microbiano, na hidrólise catalítica de óleos e gorduras por meio de reações de esterificação e transesterificação. Recentemente, estas enzimas foram incluídas em possíveis rotas de produção de biodiesel onde atuam como biocatalisadores no processo de transesterificação. Do ponto de vista do saneamento, a produção de biodiesel pode ser realizada a partir do gerenciamento de resíduos oleosos, os quais, quando convenientemente tratados e processados por via enzimática, podem render significativa produção deste importante biocombustível. O presente estudo teve por objetivo avaliar a biodegradação e atividade lipolítica de cepas bacterianas em resíduos oleosos do saneamento ambiental, representado pela espuma de caixa de gordura, visando à avaliação de sua capacidade hidrolítica em ensaios de bancada. A atividade lipolítica foi avaliada por espectrofotometria, pelo método de respirometria aeróbia e pelo teor de óleos e graxas, utilizando como substratos os resíduos oleosos de caixa de gordura da ETE-UFES, do RU-UFES, lodo UASB (5% de óleo de soja) e óleo de fritura. Foram isoladas 24 cepas bacterianas, das quais 18 foram selecionadas pelo método de rodamina-B como bactérias lipolíticas. A atividade lipolítica por espectrofotometria dos isolados evidenciou uma resposta diversificada, variando de 0,02 U/mg a 3,25 U/mg de proteína. A cepa "C1" inoculada em meio mínimo com óleo de soja, apresentou valores médios de atividade lipolítica de 3,25 U/mg de proteína. Esta atividade representa cerca de 20% em relação à atividade da enzima comercial utilizada. Nos estudos de respirometria e decaimento de O&G, pode-se observar que, durante o período avaliado, os diferentes potenciais de degradação estão relacionados à atividade lipolítica das cepas por espectrofotometria. As maiores produções de CO<sub>2</sub> foram observadas para a lipase comercial, seguida pela cepa "C1", variando de 313,64 a 1563,89 mg de CO<sub>2</sub>. A cepa "C1" obteve remoção 87,23% de O&G de combinada com o resíduo de caixa de gordura da ETE-UFES. Desta forma, concluiu-se que há viabilidade em avaliar a atividade lipolítica pelos métodos de respirometria aeróbia e o decaimento de O&G.

Palavras-chave: Isolados bacterianos; Lipases; Atividade lipolítica; Respirometria aeróbia.



## ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol acyl hydrolases, (E.C. 3.1.1.3) are enzymes, which have the ability to catalyze the hydrolysis of fats and oils in the esterification and transesterification reactions. Currently, these enzymes for the production of biodiesel, has been included as biocatalyst in the transesterification process. In the wastewater view, the biodiesel production could be converted from waste and animal fats, which they have focused on the use in enzymatic process to rendered as biodiesel feedstocks. In the present study was, therefore, to evaluate the biodegradation and lipolytic activity into microbial removal of grease-containing wastewater developed in a batch scale. The lipolytic activity was measured by spectrophotometry, aerobic respirometric methods and oils and greases contents for application in grease-trap samples from ETE-UFES, RU-UFES, UASB sludge (5% of soy oil) and frying oil. In the initial screening, 24 bacterial strains were isolated which 18 of them, capable as lipolytic bacteria, selected by Rhodamine B method. Spectrophotometric assay the lipolytic activity showed on these 18 strains a large range value of 0.02 to 3.25 U/mg of protein and the last one was strain C1, incubated with soy oil. This activity represents about 20% in commercial lipase activity. A comparison of the performances of spectrophotometric method was shown with respirometric and decay of O&G studies during that evaluation period with respective different potentials of degradation. The highest productions of CO<sub>2</sub> was obtained in the commercial lipase AK Amano 20 (Amano Co., Japan), followed by strain "C1", ranging from 313.64 to 1563.89 mg CO<sub>2</sub>. Strain "C1" removed 87.23% of O&G inoculated with the residue of grease-trap of ETE-UFES. Thus, respirometric methods and decay of O&G for using techniques developed for evaluating lipolytic activity were available.

Keywords: Bacterial isolates; Lipases; lipolytic activity, Aerobic respirometry.

## *Lista de figuras*

Figura 1 – Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases.....	23
Figura 2 – Modelo tridimensional da lipase de <i>Burkholderia (Pseudomonas) cepacia</i> com adaptações. Fonte: NCBI 2009.....	25
Figura 3 – Representação esquemática de um possível complexo tetraédrico enzima-substrato para uma reação de hidrólise de um éster ou transesterificação de um álcool catalisada por uma lipase de <i>Candida rugosa</i> . Baseado em Cygler, M. et al.....	26
Figura 4 – Reação de transesterificação de óleos vegetais com álcool formando ésteres e glicerol (adaptado de SCHWAB, BAGBY e FREEDMAN, 1987) .....	43
Figura 5 – Mecanismo da reação de transesterificação dos triacilglicerídeos. Fonte: Adaptado de SCHUCHARDT et al., 1998.....	44
Figura 6 – Mecanismo da reação de saponificação de triacilglicerídeos.....	45
Figura 7 – Reação de hidrólise do p-nitrofenil palmitato e a formação do cromogênico fenolato. ....	54
Figura 8 – Fluxograma de delineamento experimental para avaliação da atividade lipolítica.....	55
Figura 9 – Fluxograma de delineamento experimental para o Sistema de respirometria aeróbia.....	59
Figura 10 – Experimento de incubação composto por 78 unidades experimentais...	60
Figura 11 – Esquema com as reações que ocorrem no sistema de respirometria aeróbia.....	61
Figura 12 – Potes de plástico herméticos de 900 mL e frascos de polietileno de 50 mL para solução de NaOH. Escuma da caixa de gordura da ETE inoculado com a cepa J liofilizada no dia 0 (A) e aos 30 dias de experimento verifica-se elevada presença de biomassa microbiana (B).....	62
Figura 13 – Esquema da extração em Soxhlet (Fonte: <a href="http://www.qmc.ufsc.br">http://www.qmc.ufsc.br</a> , 26 jun. 2008).....	63
Figura 14 – Extrator de óleos e graxas com capacidade para 8 balões de extração Soxhlet.....	64

Figura 15 - Esquema experimental do Sistema de respirometria aeróbia.....	65
Figura 16 – Reação apresentada pelas cepas lipolíticas ao teste de Rodamina B utilizando luz U.V. (350nm). (A) Cepa C1, (B) Cepa R1 e (C) Cepa J....	71
Figura 17 – Atividade lipolítica em U( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) por mg de proteína das cepas selecionadas após 120 horas de enriquecimento e grupos definidos pelo teste F. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ ), pelo teste de Tukey. ....	72
Figura 18 – Comparação da produção cumulativa de $\text{CO}_2$ ( $\text{mg}\cdot 100^{-1}$ g de substrato ) utilizando o resíduo de caixa de gordura da ETE-UFES inoculado com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle (sem inóculo). ....	77
Figura 19 – Comparação da produção cumulativa de $\text{CO}_2$ ( $\text{mg}\cdot 100^{-1}$ g de substrato ) utilizando o resíduo de caixa de gordura do R.U.-UFES inoculado com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle (sem inóculo). ....	79
Figura 20 – Comparação da produção cumulativa de $\text{CO}_2$ ( $\text{mg}\cdot 100^{-1}$ g de substrato ) utilizando lodo UASB da ETE/UFES com 5% de óleo de soja inoculado com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle (sem inóculo). ....	80
Figura 21 – Comparação da produção cumulativa de $\text{CO}_2$ ( $\text{mg}\cdot 100^{-1}$ g de substrato ) utilizando óleo de fritura inoculado com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle (sem inóculo). ....	81
Figura 22 – Gráfico de erro da produção de $\text{CO}_2$ ( $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de substrato) acumulada aos 30 dias, com intervalo de confiança de 95%, para os tratamentos realizados nos resíduos oleosos inoculados com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle.....	83
Figura 23 – Remoção de O&G ( $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de substrato) nos diversos tratamentos realizados com o resíduo oleoso proveniente de caixa de gordura da ETE-UFES. ....	85
Figura 24 – Remoção de O&G ( $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de substrato) nos diversos tratamentos realizados com o resíduo oleoso proveniente de caixa de gordura do RU-UFES.....	86

Figura 25 – Remoção de O&G ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de substrato) nos diversos tratamentos realizados com o lodo UASB da ETE-UFES.....	87
Figura 26 – Remoção de O&G ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de substrato) nos diversos tratamentos realizados com o óleo de fritura.....	88
Figura 27 – Gráfico de erro da remoção de O&G ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de substrato) aos 30 dias, com intervalo de confiança de 95%, para os tratamentos realizados nos resíduos oleosos inoculados com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle..	89
Figura 28 – Remoção percentual de O&G nos diversos tratamentos realizados com os resíduos oleosos e ou gordurosos. (A) resíduo da caixa de gordura ETE-UFES, (B) resíduo da caixa de gordura do R.U.-UFES , (C) lodo UASB ETE-UFES e (D) óleo de fritura.....	90

## *Lista de tabelas*

Tabela 1 - Aplicações de lipases de acordo com o tipo de reação catalisada.....	31
Tabela 2 - Especificações do óleo diesel e do biodiesel de óleo de frituras. Fonte: adaptado de MITTELBACH E TRITTHART (1988).....	39
Tabela 3 - Vantagens e desvantagens dos processos químicos e enzimáticos na produção de biodiesel. Fonte: Nascimento, 2001.....	42
Tabela 4 – Rendimentos dos ésteres (%) obtidos através da reação de transesterificação enzimática do óleo de girassol com e sem solvente. Fonte: Adaptado de Mittelbach (1990).....	46
Tabela 5 – Rendimentos dos ésteres (%) obtidos através da reação de transesterificação enzimática de triglicerídeos com alcoóis primários e secundários. Fonte: Adaptado de Nelson, Foglia e Marmer (1996).....	47
Tabela 6 – Resumo de metodologias das análises físico-químicas. ....	50
Tabela 7 – Dados físico-químicos dos resíduos oleosos derivados de sistema de tratamento de esgoto.....	66
Tabela 8 – Caracterização de cepas bacterianas obtidas a partir de resíduos oleosos e gordurosos oriundos de caixa de gordura domiciliar e do RU UFES. ....	69
Tabela 9 – Tabela com os valores de CO <sub>2</sub> produzido e letras para indicar a diferença estatística significativa. ....	78
Tabela 10 – Estatística descritiva para os dados de Concentração de O&G (mg/100g de substrato).....	113
Tabela 11– Estatística descritiva para os dados de Respirimetria Aeróbia.....	114
Tabela 12 – Tabelas de ANOVA a 5% de significância comparando as diversas interações. ....	118
Tabela 13 – Remoção de O&G (mg.100g <sup>-1</sup> de substrato) aos 30 dias, nos diversos tratamentos realizados com os resíduos oleosos e grupos definidos pelo teste F. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ( p>0,05), pelo teste de Tukey. ....	119
Tabela 14 – Produção acumulada de CO <sub>2</sub> (mg.100g <sup>-1</sup> de substrato) aos 30 dias, nos diversos tratamentos realizados com os resíduos oleosos e	

grupos definidos pelo teste F. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ), pelo teste de Tukey. .... 120

## *Lista de siglas*

ABNT	Associação Brasileira de normas técnicas
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	Sulfato de Alumínio
ANOVA	Analysis of variance
°API	Graus American Petroleum Institute
BSA	Soro de albumina bovina
°C	Graus Celsius
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
C/N	Relação carbono – nitrogênio
$\text{DBO}_5$	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ES	Espírito Santo
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
$\text{FeCl}_3$	Cloreto de Ferro III
$\text{FeSO}_4$	Sulfato ferroso
$\text{H}_2\text{CO}_3$	Ácido carbônico
$\text{g/cm}^3$	Densidade relativa
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato monobásico de potássio
L	Litro
LABSAN	Laboratório de Saneamento da UFES
$\text{m}^2$	Metro quadrado
$\text{m}^3$	Metro cúbico
mg	Miligrama
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnésio heptahidratado
mL	Mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitro
mm	Milímetro
n	Número de amostras
N/C	Não consta
NaCl	Cloreto de sódio

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hidrogenofosfato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NBR	Norma Brasileira
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amônio
NTK	Nitrogênio Total de Kjeldahl
OD	Oxigênio Dissolvido
pH	Potencial Hidrogeniônico
PROSAB	Programa de Pesquisa em Saneamento Básico
rpm	Rotações por minuto
S.R.A	Sistema de Respirometria Aeróbia
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
ST	Sólidos Totais
SV	Sólidos Voláteis
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket ou Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente em Manto de Lodo
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume



# *Sumário*

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>23</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
4.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	49
4.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS OLEOSOS E GORDUROSOS .	49
4.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE LIPOLÍTICAS.....	50
4.3.1 Enriquecimento e isolamento de bactérias potencialmente lipolíticas.....	50
4.3.2 Seleção de bactérias lipolíticas pelo método de Rodamina-B.....	51
4.3.3 Caracterização bioquímica dos isolados bacterianos .....	51
4.3.3.1 Método de Gram.....	52
4.3.3.2 Teste de Vermelho de Metila (V.M.) .....	52
4.3.3.3 Teste de Coagulase conjugada (teste em lâmina) .....	53
4.3.3.4 Teste de indol .....	53
4.3.3.5 Teste de catalase .....	53
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE CEPAS BACTERIANAS POR ESPECTROFOTOMETRIA .....	54
4.4.1 Estruturação do experimento .....	55
4.4.2 Quantificação de proteína por método de Bradford .....	55
4.4.3 Avaliação da atividade lipolítica .....	56
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE CEPAS BACTERIANAS E UMA LIPASE COMERCIAL, ATRAVÉS DO MONITORAMENTO PARALELO DO TEOR DE ÓLEOS E GRAXAS E DA BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DE DIFERENTES RESÍDUOS OLEOSOS ORIUNDOS DO SANEAMENTO AMBIENTAL. ....	57

4.5.1 Características e preparação do substrato do Sistema de Respirometria Aeróbia.....	57
4.5.2 Preparação dos resíduos oleosos.....	58
4.5.3 Preparação das cepas bacterianas e da enzima comercial para o experimento de biodegradação aeróbia.....	58
4.5.4 Processo de biodegradação aeróbia, por respirometria.....	58
4.5.5 Avaliação do CO <sub>2</sub> produzido.....	60
4.5.6 Avaliação do teor de óleos e graxas, durante o processo de biodegradação aeróbia por respirometria. ....	62
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS OLEOSOS E GORDUROSOS ESTUDADOS.....	66
5.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS.....	67
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE CEPAS BACTERIANAS POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	72
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE CEPAS BACTERIANAS E DE UMA LIPASE COMERCIAL, ATRAVÉS DO MONITORAMENTO PARALELO DO TEOR DE ÓLEOS E GRAXAS E DA BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DE DIFERENTES RESÍDUOS OLEOSOS ORIUNDOS DO SANEAMENTO AMBIENTAL.....	75
5.4.1 Avaliação do processo de biodegradação aeróbia por respirometria.....	75
5.4.2 Avaliação do teor de óleos e graxas, durante o processo de biodegradação aeróbia por respirometria. ....	84
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>7. RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>94</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>111</b>

<b>MATERIAL .....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO C .....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXO D .....</b>	<b>119</b>

# ***1. INTRODUÇÃO***

Os lipídeos abrangem óleos, graxas, gorduras e ácidos graxos livres que, juntamente com proteínas e carboidratos, compõem os principais compostos orgânicos de águas residuárias. Os óleos e gorduras têm um papel fundamental na alimentação humana, pois fornecem calorias, agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis e são fontes de ácidos graxos essenciais. Mundialmente é estimada uma produção anual de óleos e gorduras de 100 milhões de toneladas (GUNSTONE, 1999). Os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras são os triglicerídeos e suas propriedades físicas dependem da estrutura dos ácidos graxos presentes (GRAMPONE, 1993).

No Brasil, vários segmentos industriais são grandes geradores de efluentes ricos em óleos e graxas. Com o aumento da atividade industrial, agravou-se na quantidade de efluentes gerados, os quais, em sua maioria, não são tratados ou não recebem o tratamento adequado, aumentando o impacto ambiental, tornando-se um preocupante problema ambiental. Para controlar essa situação, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), pelo artigo 34 da resolução nº 357 de 17 de março de 2005, estabeleceu as seguintes condições de lançamento em corpos hídricos para efluentes de qualquer fonte poluidora: pH entre 5,0 e 9,0; temperatura inferior a 40°C, sendo que a temperatura do corpo hídrico receptor não deverá exceder a 3°C na zona de mistura; concentração de óleo mineral até 20 mg/L e para óleos vegetais e gorduras animais até 50 mg/L (CONAMA, 2005). Com essas condições da resolução CONAMA, os efluentes das indústrias com elevados teores de lipídios enfrentam um desafio. Os teores de O&G dos efluentes variam de acordo com o tipo de atividade da indústria: 200 a 2000 mg/L para as indústrias de laticínios; 500 mg/L a 16000 mg/L para as indústrias de extração de óleos vegetais, (MENDES, CASTRO e PEREIRA, 2006). Comparando-se esses valores com os valores estabelecidos percebe-se a necessidade de tratamentos para esses efluentes.

As lipases são enzimas atuantes no metabolismo de microrganismos, que hidrolisam especificamente óleos e gorduras, liberando ácidos graxos e glicerol. No entanto, em ambientes aquo-restritos essas enzimas catalisam diversas outras reações, como reações de esterificação, interesterificação e transesterificação (JAEGER et al., 1994). A ampla gama de reações catalisadas confere às lipases um grande potencial

---

biotecnológico, sendo fundamental para a produção de biodiesel pela rota enzimática, um biocombustível que apresenta vantagens ambientais em relação aos combustíveis fósseis.

Desta forma, verificou-se a necessidade de redução da carga orgânica do efluente gerado nas indústrias alimentícias para não sobrecarregar as ETEs, de diminuir as dimensões e o custo do tratamento, e de reduzir também o problema ambiental, visto que as águas residuais podem eventualmente apresentar elevado teor de óleos e gorduras.

Dentro deste contexto, a hipótese deste estudo foi verificar a possibilidade de aplicar as metodologias de respirometria aeróbia e decaimento de óleos e graxas como forma de avaliação da atividade lipolítica de cepas bacterianas, em resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental com a finalidade de obter a potencial utilização da matéria prima e as cepas na produção de biodiesel.

---

## ***2. OBJETIVOS***

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a biodegradação e atividade lipolítica em resíduos oleosos do saneamento ambiental.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar físico-quimicamente os resíduos oleosos de caixa de gordura da ETE-UFES, do RU-UFES, lodo UASB (5% de óleo de soja) e óleo de fritura;
  - Isolar e caracterizar bactérias com atividade lipolítica;
  - Avaliar a atividade lipolítica específica de cada isolado bacteriano por espectrofotometria;
  - Avaliar a biodegradabilidade aeróbia de resíduos oleosos inoculados com bactérias produtoras de lipase;
  - Monitorar a concentração de óleos e graxas dos resíduos inoculados com bactérias lipolíticas no sistema de respirometria aeróbia.
-

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 LIPASES

As enzimas são classificadas e codificadas pela NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) de acordo com a reação catalisada. A nomenclatura utiliza a abreviação E.C. (*Enzyme Commission*) seguida de até 4 dígitos referentes à classe e subclasses a que pertence a enzima.

Lipase é o nome genérico para um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C. 3.1) e que atuam sobre ligações éster (E.C. 3.1.1).

As lipases (E.C.3.1.1.3), pela definição clássica, são glicerol éster hidrolases e, de acordo com Jaeger et al., 1994, atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol (Figura 1). No entanto, em ambientes aquo-restritos essas enzimas catalisam reações de esterificação, interesterificação e transesterificação, entre outras, o que confere às lipases um grande potencial biotecnológico (SALUM et al., 2007; PANDEY et al., 2004; JAEGER e EGGERT, 2002).

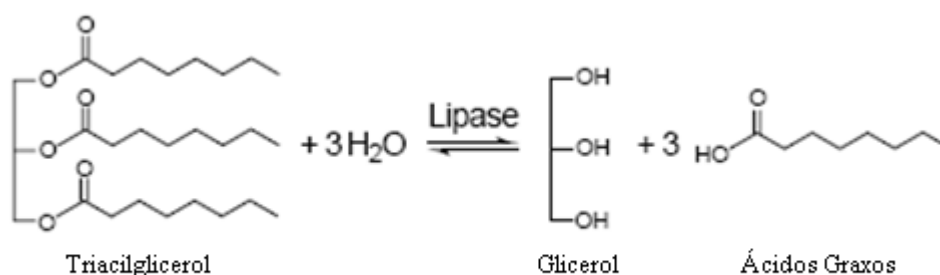


Figura 1 – Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases

Muitas aplicações interessantes têm sido encontradas para as lipases, tais como a síntese de biosurfactantes, fármacos, compostos ópticos puros e flavorizantes (KRISHNA, 2002). Estas aplicações em muitos casos são limitadas por razões econômicas. No entanto, novas lipases são necessárias com propriedades cada vez mais especializadas, além disso, a contínua demanda por enzimas altamente ativas

e que atuam sobre substratos específicos, impulsionam a pesquisa por novas fontes de enzimas (ADAMCZAK e BEDNARSKI, 2004; COSTAS, DEIVE e LONGO, 2004; REETZ, 2002).

Lipídeos, lípidios ou triglicerídeos são biomoléculas insolúveis em água, e solúveis em solventes orgânicos, como o álcool. A formação molecular mais comum desses compostos, constituindo os alimentos é estabelecida através do arranjo pela união de um glicerol (álcool) ligada a três cadeias carbônicas longas de ácido graxo, porém os lipídeos não são diretamente incorporados pelas células bacterianas (MUDRYK e SKÓRCZEWSKI, 2000). Esta é a explicação porque as bactérias são capazes de sintetizar muitas enzimas hidrolíticas, incluindo lipases, as quais catalisam reações de despolimerização de lípidios. As lipases são ativamente exportadas pelo organismo microbiano ou são liberadas como enzimas livres na lise da célula bacteriana (CHRÓST, GAJEWSKI e LALKE, 1994). A hidrólise de triacilgliceróis geralmente ocorre em algum grau de regioespecificidade, ou seja, atuam em regiões específicas da molécula do triacilglicerol permitindo grande controle sob a distribuição posicional dos ácidos graxos do produto final. Este tipo de hidrólise pode ser denominado lipólise (SILVA e GIOIELLI, 2009; CURI et al, 2002).

### 3.1.1 Características, funções e tipos

As lipases são enzimas amplamente distribuídas na natureza e estão presentes no metabolismo de animais, plantas e microrganismos. Os mecanismos de atuação dessas enzimas em reações de hidrólise ainda não são completamente elucidados, mas considerando a grande disponibilidade e a alta estabilidade das lipases extracelulares provenientes de microrganismos, elas têm um significativo potencial para uso em biotecnologia (OTERO, FERNÁNDEZ-PÉREZ e PÉREZ-GIL, 2005). Sua produção é influenciada pelo pH, temperatura, agitação e composição do meio. O tipo de fontes de carbono e de nitrogênio pode afetar a biossíntese enzimática, e a presença de compostos lipídicos e surfactantes aumenta a produção em alguns casos (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

Entre as lipases de vegetais, animais e microbianas, estas últimas são as mais utilizadas, por sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las (LIMA, 2004). Ainda, segundo Castro, Mendes e Santos (2004) estes microrganismos são de fácil obtenção e as lipases microbianas

---



possuem maior estabilidade térmica. Semionato (2006) comprovou a capacidade hidrolítica de cepas bacterianas isoladas de dispositivos de retenção de gordura da Estação experimental de Tratamento de Esgoto da Universidade Federal do Espírito Santo (ETE-UFES), demonstrando que os dispositivos de retenção de sólidos gordurosos são uma fonte importante dessas bactérias.

Lipases apresentam uma massa molar variando entre 19 a 60 kDa e possuem uma estrutura de dobramento  $\alpha/\beta$  hidrolase, sendo que muitas estruturas destas enzimas já foram definidas (Figura 2). As lipases possuem um núcleo central composto por uma folha  $\beta$  pregueada formada por 8 segmentos  $\beta$  ( $\beta 1 - \beta 8$ ), conectadas, interligadas e envolvidas por  $\alpha$ -hélices. O centro ativo é composto por uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos serina, histidina e aspartato (ou glutamato). O resíduo serina é responsável pela catálise e encontra-se ligado por ligações de hidrogênio ao resíduo histidina, que por sua vez encontra-se ligado a um resíduo carboxilado (aspartato ou glutamato) (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004; JAEGER e REETZ, 1998).

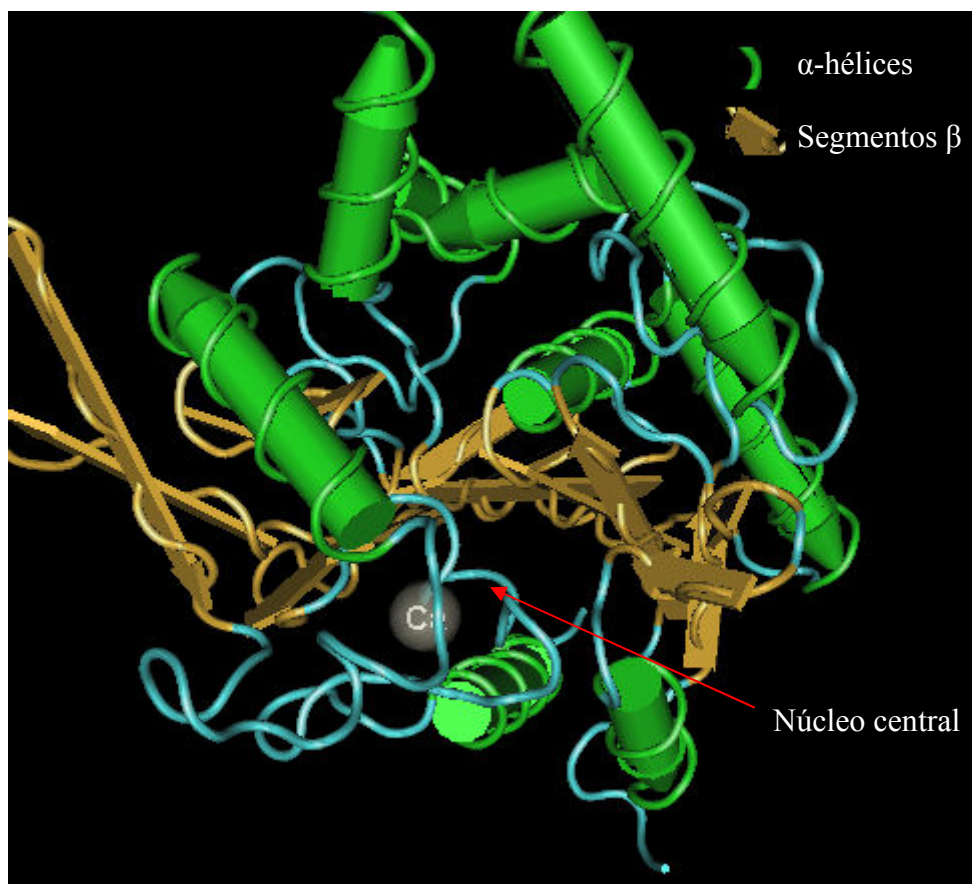


Figura 2 – Modelo tridimensional da lipase de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* com adaptações.

Fonte: NCBI 2009.

Em uma biotransformação, os substratos e os estados de transição gerados durante o processo catalítico deverão ser ligados por interações múltiplas não-covalentes com a superfície da enzima. Como consequência, a força de todas estas interações será fortemente dependente da distância e dos ângulos de interação da enzima com o substrato, resultando na formação de um sítio de ligação altamente seletivo. A discriminação entre dois enantiômeros é realizada pela enzima através de um sítio catalítico, contendo três pontos de ligação com o substrato, onde será gerado um intermediário tetraédrico, como, por exemplo, na Figura 3. Qualquer impedimento estérico devido à arquitetura ou conformação da estrutura enzimática poderá auxiliar a enzima a diferenciar estruturas semelhantes durante o processo de interação com o substrato (COSTA e AMORIM, 1999).

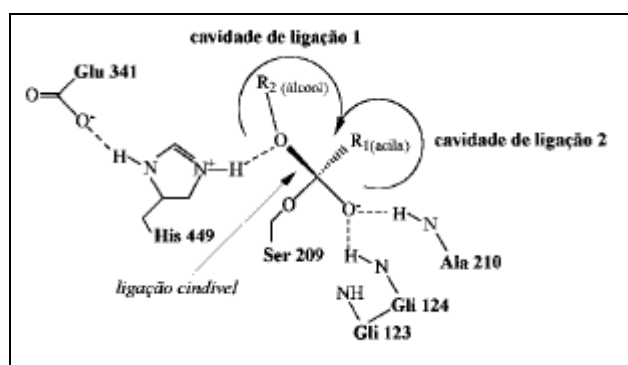


Figura 3 – Representação esquemática de um possível complexo tetraédrico enzima-substrato para uma reação de hidrólise de um éster ou transesterificação de um álcool catalisada por uma lipase de *Candida rugosa*. Baseado em Cygler, M. et al.

### 3.1.2 Microrganismos produtores de lipases

As lipases eram obtidas inicialmente a partir de pâncreas de animais e usadas como um medicamento auxiliar digestivo de consumo humano (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004). O alto custo de isolamento e purificação de lipases microbianas e de origem animal, pode ser um fator limitante a aplicação destas enzimas em escala industrial.

Dentre as bactérias produtoras de lipases, estão disponíveis comercialmente as enzimas de *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia* (anteriormente *Pseudomonas*) *cepacia* para a aplicação em síntese quiral, e as

lipases de *Burkholderia sp.* e *Arthrobacter sp.* para a quantificação de triacilglicerídeos. O rápido crescimento celular, em relação aos fungos, é uma das vantagens das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999).

A *Burkholderia cepacia* produz um extrato lipolítico com altas concentrações de lipases (33000 U/L) por fermentação submersa. No entanto, estudos realizados por fermentação no estado sólido (FES) demonstraram que a bactéria também produz grandes concentrações da enzima quando cultivada com farelo de girassol e farelo de trigo. Além disso, os ensaios preliminares de atividade e estabilidade em solução revelaram que a enzima atua e é estável em uma ampla faixa de pH (3 a 10), mantém atividade em temperaturas relativamente altas (20 a 55°C) e é estável a solventes orgânicos polares e apolares (LIMA, 2004).

As fontes fúngicas têm sido também preferencialmente utilizadas, não necessariamente devido às suas melhores características em relação a lipases bacterianas, mas sim porque na sua grande maioria não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como GRAS (Generally Regarded as Safe, Jaeger et al., 1994). Fungos de diversos gêneros são bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. Por exemplo, lipases de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium roqueforti* e da levedura *Candida rugosa* são comercializadas atualmente pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltd., UK) para processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicerídeos, como aditivo em preparações digestivas e para síntese quiral.

A diversidade microbiana na natureza é extraordinária. Mais de 400.000 microrganismos são conhecidos e isto é só uma fração do número de espécies existentes, estimado entre 4 a 5 milhões. Nos próximos anos, cerca de 100 projetos de seqüenciamento genômico estarão concluídos, revelando informações sobre mais de 300.000 genes, muitos dos quais novos e sem função conhecida (FRASER e DUJON, 2000). Estes números, por si só, justificam a busca e a seleção de cepas microbianas selvagens, potenciais produtoras de enzimas ou outros metabólitos com características especiais e passíveis de aplicação em processos, sejam ligados ao saneamento ou industriais.

---

### 3.1.3 Isolamento e seleção de bactérias lipolíticas

Semionato (2006) isolou 27 cepas de bactérias provenientes de amostras retiradas da espuma dos dispositivos de remoção de gordura (ETE - UFES), as quais resultaram numa seleção de 19 cepas de bactérias lipolíticas, quando submetidas ao teste de Rodamina B.

As bactérias lipolíticas gram negativas do gênero *Pseudomonas* apresentam grande produção de lipase extracelular e, conseqüentemente, alta eficiência catalítica (DHARMSTHITI e KUHASUNTISOOK, 1998; HABA et al., 2000; JAEGER e EGGERT, 1994). Algumas bactérias lipolíticas gram positivas, tais como os gêneros: *Clostridium*, *Bacillus* e *Staphylococcus*, também apresentaram atividade lipolítica, porém, menos expressiva que a das bactérias gram negativas (WAKELIN e FORSTER, 1997; ROUSENAU e JAEGER, 2000; JAEGER e EGGERT, 1994).

O teste de rodamina B detecta a presença de lipase extracelular de microrganismo lipolítico com atividade lipolítica mínima de 0,002 U/mg por proteína (JETTE e ZIOMEK, 1994). A elevada sensibilidade do teste detecta atividade lipolítica mesmo em microrganismos que apresentam baixa produção de lipase extracelular (MACKENZIE et al., 1967; KOUKER e JAEGER, 1987; JARVIS e THIELE, 1997, BREISSON et al., 2000).

Segundo Haba et al. (2000), o tempo de incubação do teste é função do tempo de crescimento de cada espécie de bactéria. Esses pesquisadores avaliaram a atividade lipolítica em vários gêneros de bactérias (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Candida*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* e *Serratia*) e o teste de rodamina B variou entre 24 e 72 horas a 30°C.

Utilizando o efluente de esgoto sanitário como fonte de bactérias, Haba et al. (2000), conseguiram isolar 47 cepas de bactérias, das quais 40 apresentaram atividade lipolítica e foram selecionadas também pelo teste da rodamina B. Jarvis e Theile (1997) isolaram bactérias do esgoto sanitário proveniente de um reator anaeróbio, em escala piloto, selecionando 5 cepas de bactérias lipolíticas do gênero *Clostridium* também através do teste de rodamina B.

#### 3.1.4 Atividade específica

A atividade lipolítica pode ser determinada de diversas formas como por titulação dos ácidos graxos liberados com solução de KOH 50 mM usando fenolftaleína como indicador (HOOVER, LAURENTIUS e GUNETILEK, 1973). Para o cálculo da atividade enzimática usa-se uma curva padrão de concentração de ácido graxo em função do volume de KOH, sendo o ácido graxo específico para cada substrato. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mM de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio.

Outro método para quantificação da atividade de lipases é o Índice Enzimático (IE). Este pode ser expresso pela relação entre o diâmetro do halo de degradação do substrato, pelo diâmetro de crescimento da colônia de microrganismo crescida em meios específicos (HANKIN, ZUCKER e SANDS, 1971; HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975). A atividade enzimática pode ser determinada crescendo inicialmente os isolados em meio líquido, e posteriormente inocula-se alíquotas em placas de Petri contendo o meio específico para a enzima investigada. As placas são incubadas a 30°C por 96 horas e o IE é determinado após este tempo de incubação, de acordo com as metodologias específicas para cada enzima.

A Espectrofotometria é, indubitavelmente, o método mais exato para a determinação da concentração de substâncias em solução. Mas os instrumentos são mais dispendiosos do que os que foram descritos anteriormente. A palavra espectrofotometria designa um método de análise baseado em medidas de absorção de radiação eletromagnética. A técnica que aqui se descreve esta restrita a uma pequena região de comprimento de onda da radiação eletromagnética, que corresponde à luz visível ou ultravioleta: é a faixa entre aproximadamente 200 e 700 nm (1 nanômetro =  $10^9$  m 700 nm = 0,7  $\mu$ m). Um espectrofotômetro pode ser considerado como um fotômetro fotoelétrico de filtro refinado que permite o uso de faixas de luz aproximadamente monocromáticas continuamente variáveis. (LEHNINGER, NELSON e COX, 2001).

#### 3.1.5 Aspectos biotecnológicos

As lipases são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, para conferir ou modificar propriedades organolépticas dos alimentos, tais como aroma, textura e

---

digestibilidade. Além disso, são usadas no processamento de óleos e graxas, detergentes, na síntese química e farmacêutica, na indústria de papel, e na produção de cosméticos e farmacêuticos (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006). Algumas aplicações industriais de lipases são mostradas na Tabela 1.

A maior importância comercial atualmente reside na aplicação de lipases em detergentes industriais ou domésticos (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006). As lipases para detergentes devem possuir características de baixa especificidade ao substrato, hidrolisando gorduras de várias composições, e serem ativas e estáveis em condições normalmente consideradas agressivas para uma enzima, como temperaturas de 40 a 60°C, presença de detergentes e meios muito básicos (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

---

Tabela 1 - Aplicações de lipases de acordo com o tipo de reação catalisada.

<b>Tipos de Reações</b>	<b>Áreas de Aplicação</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Produtos</b>	<b>Referências</b>
<i>Hidrólise</i>				
	Alimentos (laticínios)	Hidrólise da gordura do leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados	Hasan, Shah e Hameed, 2006; Sharma, Chisti e Banerjee, 2006.
	Química (Processamento do Óleo)	Hidrolise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos (emulsificantes, reagentes para análise de lipídios)	Hasan, Shah e Hameed, 2006.
	Química (Detergente)	Remover manchas de óleo	Detergentes para lavanderias e uso doméstico	Hasan, Shah e Hameed, 2006; Sharma, Chisti e Banerjee, 2006.
	Medicina	Dosagem de triglicerídeos no sangue	Kits diagnósticos	Hasan, Shah e Hameed, 2006.
	Tratamento de efluentes	Hidrolise	Ácidos graxos	Valladão, Freire e Cammarota, 2007; Durlí 2007; Leal et al., 2006; Cammarota e Freire, 200; Rosa, 2004.
<i>Esterificação</i>				
	Química Fina	Síntese de ésteres	Intermediários quirais Ésteres, emulsificantes	Salum et al., 2007; Fernandes et al., 2007; Hasan et al., 2006.
	Química Alimentos	Esterificação ou Transesterificação	Óleos ou gorduras, Flavorizantes e aromatizantes.	Hasan et al., 2006.
	Química farmacêutica	Síntese de intermediários de medicamentos preparação de intermediários homoquirais	Drogas antiinflamatórias como naproxeno, ibuprofeno, cetoprofen, suprofen.	Jaeger & Eggert, 2002.
<i>Transesterificação</i>				
	Química Fina	Transesterificação de óleos vegetais	Biodiesel	Fernandes et al., 2007; Hasan et al., 2006.

Muitos estudos estão sendo realizados para a utilização de lipases no tratamento de efluentes como uma alternativa ou complemento aos tratamentos convencionais. Resíduos industriais ricos em óleos e materiais graxos provenientes de restaurantes, laticínios e indústrias processadoras de carne podem ser tratados através do uso de

lipases de diferentes origens. O tratamento enzimático de efluentes é interessante, pois ajuda a melhorar a eficiência dos tratamentos convencionais. Além disso, as enzimas atuam em poluentes específicos e, com os avanços da biotecnologia, algumas enzimas podem ser produzidas de forma econômica. Dentro deste contexto, diversos trabalhos relatam a utilização de preparados enzimáticos obtidos por fermentação em estado sólido como uma alternativa de baixo custo para o tratamento de efluentes com elevados teores de gordura gerados na indústria de alimentos (VALLADÃO, FREIRE e CAMMAROTA, 2007; LEAL et al., 2006, 2002; ROSA, 2004; JUNG et al., 2002; CAMMAROTA, TEXEIRA e FREIRE, 2001).

### 3.2 RESÍDUOS OLEOSOS DO SANEAMENTO

A presença de óleos e graxas em grandes quantidades no esgoto sanitário provoca vários problemas na rede coletora e no tratamento. Estes compostos promovem uma intensa agregação de sólidos e partículas em suspensão que gera o entupimento nas redes, dutos e reservatórios do sistema de tratamento de esgotos. Outros problemas advindos da presença de sólidos gordurosos são: mau cheiro, transbordamento de fossas e caixas de gordura (WILLEY, 2001)

A presença de óleos e graxas nos esgotos sanitários está relacionada ao uso de alimentos como: óleos vegetais, manteigas, carne, entre outros. Os compostos gordurosos, em geral, não são desejáveis nas unidades de transporte e de tratamento dos esgotos, pois aderem às paredes das tubulações e diminuem as seções úteis, formam espuma, camada de matéria flutuante de compostos gordurosos, que poderá vir a comprometer o funcionamento das unidades subsequentes de uma estação de tratamento de esgoto, como também, interferir e inibir microrganismos e ocasionar problemas de manutenção (JORDÃO E PESSOA, 2005).

Os lipídeos presentes no efluente possuem baixa degradabilidade que causam problemas nos processos biológicos anaeróbios e aeróbios do sistema de tratamento de esgoto causando danos operacionais (CAMMAROTA, TEXEIRA e FREIRE, 2001; JUNG et al., 2002) No tratamento de compostos gordurosos os lipídeos representam em torno de 50% da DQO do resíduo (RAJEAHWARI et al., 2000)

---



### 3.2.1 Produção de resíduos oleosos em sistemas de saneamento

Os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras são os triglicerídeos e suas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes (GRAMPONE, 1993). Os óleos e gorduras naturais podem ser o único constituinte de uma substância, ou podem fazer parte da mistura de diversos constituintes em um produto. Existem casos, entretanto, que se torna necessário modificar as características desses materiais, para adequá-los a uma determinada aplicação. Portanto, o setor industrial de óleos e gorduras tem desenvolvido diversos processos para manipular a composição das misturas de triglicerídeos (CASEY, 1992; HAMMOND e GLATZ, 1988).

No Brasil, os setores de indústrias de carne e laticínios são responsáveis por uma parte importante da economia do país. Em 2005,  $21 \times 10^6$  m<sup>3</sup> de leite foram produzidos no Brasil (IBGE, 2005), gerando aproximadamente  $84 \times 10^6$  m<sup>3</sup> de efluentes e 84000 toneladas de óleos e graxas. Um levantamento feito com pequenos e médios laticínios no estado de Minas Gerais revelou que 90% dos efluentes gerados nesses estabelecimentos não recebem tratamento adequado (CAMMAROTA e FREIRE, 2006).

### 3.2.2 Tratamento de efluentes com alto teor de lipídios

Os efluentes das indústrias de refino de óleos vegetais apresentam altos teores de lipídios e uma elevada DQO, resíduos de insumos agrícolas, inclusive pesticidas, e de substâncias resultantes do processo de refino. Geralmente tais resíduos são submetidos a processos físico-químicos, seguidos de tratamento biológico para remoção de poluentes coloidais. A etapa físico-química consiste na separação do óleo por flotação, floculação de sólidos totais e coagulação da matéria orgânica. A etapa biológica que se segue pode ser conduzida em lagoas ou filtros biológicos, onde a matéria orgânica é degradada pelos microrganismos que existem naturalmente nestes efluentes. Os efluentes assim tratados seguem para corpos receptores (AZBAR e YONAR, 2004).

Os processos físico-químicos empregam compostos inorgânicos como  $Al_2(SO_4)_3$ ,  $FeCl_3$  e  $FeSO_4$  que permitem apenas uma remoção parcial de sólidos totais (MENDES, CASTRO, e PEREIRA, 2006). Além disso, os reagentes químicos

---

empregados são de custo elevado e causam uma redução na remoção dos sólidos dissolvidos e de óleos e graxas (O&G) nos processos biológicos, pois a presença destes sais pode inibir a atividade microbiana (CAMMAROTA e FREIRE, 2006; VIDAL et al., 2000).

Na etapa de floculação, há a separação dos sólidos em suspensão e a flotação dos óleos e gorduras presentes no efluente. Esta etapa do processo de tratamento requer operação cuidadosa e um controle rigoroso das condições operacionais, para garantir um bom nível de remoção de gordura. No entanto, a grande variação das características físico-químicas e da carga orgânica do efluente muitas vezes leva a problemas operacionais e perda de eficiência. Além disso, níveis de gordura acima de 150 mg/L podem prejudicar o desempenho do processo biológico subsequente, levando à colmatação de filtros em reatores anaeróbio e aeróbio, além da inibição do metabolismo microbiano (PEREIRA et al., 2003; VIDAL et al., 2000).

Ao final do processo, caixas de gordura são utilizadas para separar a fração restante dos sólidos que o flotor não conseguiu retirar, formando uma massa branca, que é misturada à borra oleosa proveniente do refino e à gordura do flotor. Muitas vezes, o resíduo lipídico flotado é descartado em aterros sanitários, o que polui o ambiente (MONGKOLTHANARUK e DHARMSTHITI, 2002). As caixas de gordura comuns permitem a separação da massa de gordura por retirada manual ou por meio de raspadores. Para melhor desempenho dessas caixas, devem ser evitadas temperaturas superiores a 35°C e valores de pH acima de 8,5 na alimentação da caixa, pois nessas condições ocorre a saponificação ou emulsificação das gorduras (MENDES, CASTRO, e PEREIRA, 2006). Além disso, os óleos e graxas podem solidificar em temperaturas baixas ocasionando problemas operacionais, e ainda um acúmulo de efluentes com odores desagradáveis (VALLADÃO, FREIRE e CAMMAROTA, 2007).

Alguns métodos convencionais para tratamento de efluentes incluem a reutilização de certas frações de soro de queijo em indústrias de laticínios e de sangue em matadouros. Quando isso não é possível, vários processos são usados, dentre eles principalmente os processos aeróbios, mas nas duas últimas décadas o uso de processos anaeróbios venha aumentando (CAMMAROTA e FREIRE, 2006). Esse tipo de processo apresenta diversas vantagens como: dispensa a aeração, baixo consumo de energia, baixos custos de implantação, baixa produção de sólidos, aplicabilidade em pequena e grande escala, tolerância a elevadas cargas orgânicas

---

e baixo consumo de nutrientes (MENDES, CASTRO, e PEREIRA, 2006; ROSA, 2004). Processos biológicos convencionais, aeróbios ou anaeróbios, requerem uma relação DBO/DQO (razão de biodegradabilidade) de no mínimo 0,4 (MORAIS, 2005), para que o consórcio de microrganismo consuma a matéria orgânica sem prejudicar o desempenho do tratamento biológico. No entanto, os efluentes gerados nas indústrias de refino de óleo e os produzidos pelas indústrias de laticínios geralmente apresentam DBO/DQO de 0,2, indicando a necessidade de um pré-tratamento antes da etapa biológica (AZBAR e YONAR, 2004).

Dentre os principais tratamentos de natureza aeróbia destaca-se o processo de lodo ativado (JUNG et al., 2002). Este é um processo fundamentado no fornecimento de oxigênio para que os microrganismos biodegradem a matéria orgânica dissolvida e em suspensão, transformando-a em gás carbônico, água e flocos biológicos (GIORDANO, 2004). Os flocos biológicos são formados por consórcios de microrganismos que constituem comunidades dinâmicas, cada uma das quais possuem determinada atuação no processo de lodos ativados. A sedimentação da biomassa, necessária para separação do efluente tratado, só é possível graças à floculação (MORAIS, 2005). Os sistemas de lodos ativados são em geral compostos por: tanque (reator biológico), sistema de aeração, decantador secundário e sistema de recirculação e descarte do lodo. No reator biológico ocorre a exposição da matéria orgânica à massa biológica, a qual em presença de oxigênio cresce e flocula (VON SPERLING, 1997).

No tratamento de efluentes industriais de laticínios, processos aeróbios são comumente empregados devido ao grande conteúdo de matéria orgânica biodegradável presente. Estes sistemas apresentam boa redução de matéria orgânica, boa resistência a choques de carga orgânica e boa flexibilidade operacional. Por outro lado, os custos, tanto os de implantação quanto os operacionais, são elevados, a supervisão do processo deve ser contínua e a disposição do lodo excedente pode apresentar problemas (ROSA, 2004).

Nos sistemas de lodos ativados, o alto teor de O&G forma uma camada na superfície do tanque de aeração, que afeta principalmente a eficiência de transferência de oxigênio. Isto dificulta as trocas gasosas no tanque de geração necessárias para a degradação biológica, ocasionando o desenvolvimento de bactérias filamentosas que, por sua vez, dificultam a sedimentação do lodo e

---

prejudicam o desempenho dos sistemas em termos de remoção de matéria orgânica. (CAMMAROTA e FREIRE, 2006, JUNG et al., 2002).

As lagoas aeradas são normalmente construídas com taludes de terra, na profundidade de 2,5 a 5,0 m, e funcionam como reatores biológicos de crescimento suspenso, com recirculação do lodo. São normalmente usados aeradores mecânicos para a mistura e aeração da massa líquida (D'ALMEIDA e VILHENA, 2000).

DURAN e ESPOSITO (1997) citam as variações na composição do efluente e na temperatura ambiente às quais a lagoa está exposta como os principais fatores que afetam a eficiência das lagoas aeradas, prejudicando a redução dos níveis de sólidos suspensos e da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) em efluentes. Os autores advertem também para o problema da geração de grande quantidade de sólidos resultante do tratamento aeróbio por lodos ativados.

O processo anaeróbio é efetuado por bactérias que não necessitam de oxigênio para a sua respiração. Na lagoa anaeróbia, a matéria orgânica é decomposta gradativamente em estruturas moleculares menores, sendo os produtos finais da degradação fermentativa o metano e o gás carbônico. Lagoas anaeróbias são tanques com profundidade de 4,0 a 5,0 m, para reduzir penetração do oxigênio da superfície nas camadas mais profundas. A carga orgânica aplicada nestas lagoas deve ser alta, principalmente para que a taxa de consumo de oxigênio seja várias vezes superior à taxa de produção de biomassa, criando condições estritamente anaeróbias (MORAIS, 2005).

Óleos e graxas, em elevadas quantidades podem ficar retidos na superfície das lagoas anaeróbias podendo dificultar o transporte de substratos solúveis para a biomassa e, conseqüentemente, podem reduzir a taxa de conversão do substrato (VALLADAO, FREIRE e CAMMAROTA, 2007). A hidrólise de triacilgliceróis libera ácidos graxos de cadeia longa e glicerol. Quando esses ácidos graxos de cadeia longa estão em excesso, ocorre a adsorção deles na superfície do lodo, dificultando o transporte de substratos solúveis para os microrganismos, bem como a formação de grânulos de lodo nos reatores (OMIL et al., 2003; MASSE, KENNEDY e CHOU, 2001, MASSE et al., 2002).

O tratamento anaeróbio vem sendo cada vez mais utilizado por agroindústrias e indústrias de alimentos, porque traz algumas vantagens: não exige equipamento para aeração, e produziu menor quantidade de lodo, em relação ao processo aeróbio (VIDAL et al., 2000). Porém, existem algumas preocupações sobre a

---

capacidade de degradação de O&G nesse sistema (LEAL et al., 2006). Em efluentes com grande quantidade de gorduras, como efluentes de laticínios, por exemplo, a digestão anaeróbia pode ser problemática, pois pode ocorrer flotação do lodo, formação de espuma na superfície do reator e acúmulo de compostos intermediários (MENDES, CASTRO, e PEREIRA, 2006). Além disso, a baixas temperaturas as gorduras podem se solidificar, causando problemas operacionais como a colmatação e desenvolvimento de odores desagradáveis (CAMMAROTA, TEXEIRA e FREIRE, 2001).

### 3.2.3 Resíduos oleosos e biocombustíveis

Atualmente, a reciclagem de resíduos agrícolas e agro-industriais ganha espaço cada vez maior, não simplesmente porque os resíduos representam “matérias primas” de baixo custo, mas, principalmente, porque os efeitos da degradação ambiental decorrente de atividades industriais e urbanas atingem níveis cada vez mais alarmantes. Vários projetos de reciclagem têm sido bem sucedidos no Brasil e dentre eles destacam-se o aproveitamento de papel, plásticos, metais, óleos lubrificantes automotivos e industriais, soro de leite e bagaço de cana (COSTA NETO et al., 2000).

Mais recentemente, a implantação de Programas de Qualidade Total tem reduzido o impacto poluidor de várias atividades de natureza agroindustrial. No entanto, muitos casos ainda prevalecem sem qualquer proposta de solução definitiva. Por exemplo, em abatedouros de frangos, os animais que chegam mortos e/ou são condenados pela Inspeção Federal representam em média 4-5% (OLIVEIRA, 1995). Estes animais são normalmente incinerados ou mesmo enterrados, um destino inconveniente devido à possibilidade de contaminação de lençóis freáticos com resíduos indesejáveis e/ou microrganismos patogênicos. Por outro lado, a incineração é também um processo poluente e de alto custo que vem, gradativamente, entrando em desuso. Assim, de um modo geral, o aproveitamento integrado de resíduos gerados na indústria alimentícia pode evitar o encaminhamento destes a aterros sanitários, permitindo o estabelecimento de novas alternativas empresariais e minimizando o impacto ambiental do acúmulo destes resíduos. Dentre os materiais que representam riscos de poluição ambiental e, por

---

isso, merecem atenção especial, figuram os óleos vegetais usados em processos de fritura por imersão (COSTA NETO et al., 2000).

Nye, Williamson, e Deshpande (1983) investigaram a reação de transesterificação de óleos de fritura com metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, nbutanol e 2-etoxietanol em meios ácido e básico. O maior rendimento foi obtido com o metanol em meio alcalino, utilizando hidróxido de potássio como catalisador. Nesse mesmo estudo, alguns dos ésteres de menor viscosidade foram selecionados para a realização de testes preliminares em motores do ciclo diesel. O éster metílico obtido em meio básico, e os ésteres etílico e butílico obtidos em meio ácido, não apresentaram problemas de ignição e desempenho, produzindo pouca ou nenhuma fumaça na exaustão. Os demais ésteres não foram testados por critérios de viscosidade e o rendimento da reação não serviu como parâmetro para a seleção dos ésteres a serem utilizados nos testes.

Segundo Mittelbach e Tritthart (1988), a utilização de biodiesel de óleos de fritura em motores do ciclo diesel apresentou bons resultados. Os testes foram realizados em bancada dinamométrica e em veículo de carga média com motor turbinado a diesel. Por outro lado, a avaliação da emissão de gases demonstrou que houve um aumento relativo na liberação de gases nitrogenados, particularmente quando o biocombustível foi comparado ao diesel convencional. A Tabela 2 apresenta algumas das características físicas e químicas do biodiesel usado nesses testes. Apesar de não atender a uma especificação definida, o biodiesel de óleos de fritura apresentou características bastante semelhantes aos ésteres de óleos “novos”, como uma boa homogeneidade, evidenciada pela análise de sua curva de destilação.

---

Tabela 2 - Especificações do óleo diesel e do biodiesel de óleo de frituras. Fonte: adaptado de MITTELBACH E TRITTHART (1988).

<b>Características</b>	<b>Óleo diesel*</b>	<b>Biodiesel</b>
Densidade 15°C (kg/m <sup>3</sup> )	0,849	0,888
Ponto inicial de destilação (°C)	189	307
10%	220	319
20%	234	328
50%	263	333
70%	286	335
80%	299	337
90%	317	340
Ponto final de destilação (°C)	349	342
Aromáticos (% v/v)	31,5	nd
Carbono (%)	86,0	77,4
Hidrogênio (%)	13,4	12,0
Oxigênio (%)	0,0	11,2
Enxofre (%)	0,3	0,03
Índice de cetano	46,1	44,6
Número de cetano	46,2	50,8
Valor calórico (MJ/kg)	42,30	37,50

\* Óleo diesel com especificação para combustíveis do tipo US-2D.

Apesar dos excelentes resultados obtidos por esses e outros autores, é inevitável admitir que o óleo de fritura traz consigo muitas impurezas, oriundas do próprio processo de cocção de alimentos. Portanto, para minimizar esse problema, é sempre aconselhável proceder a uma pré-purificação e secagem dos óleos antes da reação de transesterificação (COSTA NETO et al., 2000).

### 3.2.3.1 Geração de biodiesel

Segundo Costa Neto et al.(2000), de um modo geral, o biodiesel foi definido pela "National Biodiesel Board" dos Estados Unidos como o derivado mono-alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores do ciclo Diesel).

Como combustível, o biodiesel apresenta vantagens sobre os combustíveis derivados do petróleo, tais como, virtualmente livre de enxofre e de compostos aromáticos; alto número de cetano; teor médio de oxigênio; maior ponto de fulgor; menor emissão de partículas de hidrocarboneto, monóxido e dióxido de carbono; caráter não tóxico e biodegradável, além de ser proveniente de fontes renováveis

(SAAD, 2005; HASS et al. 2001; PETERSON et al., 2002; FERRARI, OLIVEIRA e SCABIO, 2005). A utilização de biodiesel como combustível apresenta um potencial promissor no mundo inteiro, sendo um mercado que cresce aceleradamente devido, principalmente, a sua enorme contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental, e por constituir uma fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros derivados do petróleo. Assim, países como França, Áustria, Alemanha, Bélgica, Reino Unido, Itália, Holanda, Finlândia, Estados Unidos, Japão e Suécia vêm investindo significativamente na produção e viabilização comercial do biodiesel, através de unidades de produção com diferentes capacidades. Pode-se dizer que o Brasil tem uma tecnologia bastante adequada, devido à disponibilidade de óleo de soja e de álcool etílico derivado da cana-de-açúcar (FERRARI, OLIVEIRA e SCABIO, 2005).

Embora os primeiros testes da utilização de biodiesel como combustível alternativo sejam do início do século XX, sua comercialização ainda apresenta algumas dificuldades tecnológicas. Um dos principais problemas técnicos está relacionado com a qualidade de ignição em relação ao diesel convencional. Entretanto, aminas e amidas terciárias de ácidos graxos, mais eficientes que os ésteres, podem corrigir essa deficiência, quando utilizados como aditivos (STOURNAS, LOIS e SERDARI, 1995). Outra dificuldade relacionada com o uso de biodiesel refere-se à emissão de gases  $\text{NO}_x$  ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$ ). A produção desses gases pela queima do biodiesel é cerca de 10% superior aos emitidos pela queima do diesel convencional. Entretanto, com o uso de conversores catalíticos nos escapes dos veículos, este impacto poluente pode ser amenizado. Os gases  $\text{NO}_2$  e  $\text{CO}$  são transformados em  $\text{N}_2$  e  $\text{CO}_2$ . Os gases  $\text{NO}_x$  estão relacionados com a formação de chuva ácida, ozônio troposférico, principal componente tóxico do “smog” fotoquímico, e o radical hidroxila, principal oxidante atmosférico responsável por inúmeras interações (PIRES, 1995; QUEIROZ, 1999).

Segundo relatório preparado pelo Ministério da Indústria e Comércio do Governo Federal foram desenvolvidos testes em território nacional com vários tipos de óleos vegetais transesterificados, puros ou misturados ao diesel na proporção de 30% (BRASIL, 1995). Nesses testes, foram percorridos mais de um milhão de quilômetros em caminhões, ônibus e tratores e os principais problemas apresentados foram o pequeno acúmulo de material nos bicos injetores e um leve decréscimo da viscosidade do óleo lubrificante (COSTA NETO, 2002).

---



Costa Neto (2002) relata que, testes de desempenho de curta duração também foram realizados em bancada dinamométrica em plena carga, com motores de injeção indireta do tipo x8/29, previamente otimizados para a queima de óleo diesel puro. Uma série de ésteres etílicos de composição química e graus de insaturação variados foram testados. Os resultados indicaram que as propriedades dos ésteres foram semelhantes às do óleo diesel, exceto pelo ponto de inflamabilidade.

A Portaria nº 42 da ANP (Agência Nacional do Petróleo, 2005) apesar de provisória, já estabelece as propriedades que serão exigidas para que esse produto seja aceito no mercado brasileiro.

### 3.2.3.2 Aspectos químicos e enzimáticos

Atualmente, a produção comercial de biodiesel é fundamentalmente realizada por via química, mas a rota enzimática tem despertado grande interesse da comunidade científica. Um aspecto comum a estes processos é a busca pela otimização das condições de reação, de modo que se tornem viáveis e disponíveis para aplicações industriais. A comparação entre o processo enzimático e químico pode ser observada na Tabela 3 (WATANABE et al., 2001; KNOTHE, 2005; MITTELBACH et al., 1990).

Tabela 3 - Vantagens e desvantagens dos processos químicos e enzimáticos na produção de biodiesel. Fonte: Nascimento, 2001.

<b>Processos</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Químico	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Simplicidade</li> <li>· Alto rendimento</li> <li>· Curto tempo de reação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Dificuldade de separação do catalisador</li> <li>· Impossibilidade de reutilização do catalisador</li> <li>· Dificuldade de utilização de etanol hidratado</li> <li>· Obtenção de produtos com menor grau de pureza</li> </ul>
Enzimático	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Facilidade de separação do catalisador (suporte)</li> <li>· Obtenção de produtos com maior grau de pureza</li> <li>· Possibilidade de utilizar etanol hidratado na reação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Longo tempo de reação</li> <li>· Custo das enzimas</li> <li>· Baixo rendimento</li> </ul>

### 3.2.3.3 Catálise química

A alcoólise de triacilglicerídeos por álcoois mono-hidroxilados é composta por três reações consecutivas e reversíveis, nas quais são formados diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos como intermediários, conforme mostrado na Figura 4 (SCHWAB, BAGBY e FREEDMAN, 1987). Sua estequiometria requer 1 mol de triacilglicerídeo para 3 mols de álcool, mas, devido ao fato desta reação ser reversível, um excesso de álcool se faz necessário para promover um aumento no rendimento da produção dos ésteres alquílicos. Assim, os triésteres de ácidos graxos que compõe os óleos vegetais são transformados em monoésteres (VAN GERPEN e KNOTHE, 2005).

Este processo é utilizado com os objetivos de melhorar a sua qualidade de ignição do biodiesel, reduzir o seu ponto de fluidez e ajustar os seus índices de viscosidade

e densidade específica (MITTELBACH et al., 1983; SHAY, 1993; STOURNAS, LOIS e SERDARI, 1995; MA e HANNA, 1999), otimizando, assim, seu uso como combustível em motores do ciclo diesel.

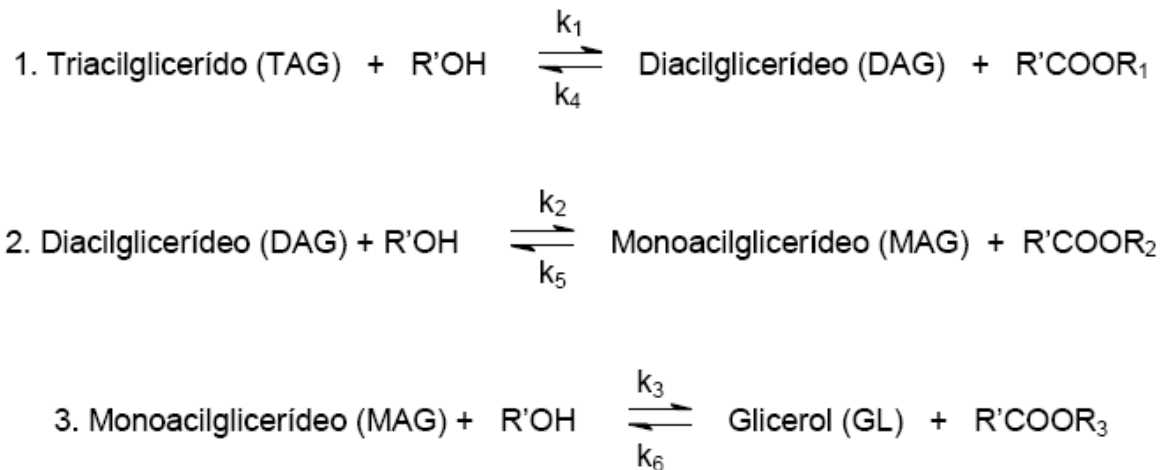


Figura 4 – Reação de transesterificação de óleos vegetais com álcool formando ésteres e glicerol (adaptado de SCHWAB, BAGBY e FREEDMAN, 1987)

A alcoólise de óleos vegetais ou gordura animal pode ser conduzida por uma variedade de rotas tecnológicas em que diferentes tipos de catalisadores são empregados, como bases inorgânicas (hidróxidos de sódio e potássio), ácidos minerais (ácido sulfúrico), resinas de troca iônica (resinas catiônicas fortemente ácidas), argilominerais ativados, hidróxidos duplos lamelares, superácidos, superbases e enzimas lipolíticas (SCHUCHARDT et al., 1998; RAMOS et al., 2003; VAN GERPEN e KNOTHE, 2005).

Ácidos de Brønsted-Lowry podem ser utilizados como catalisadores da alcoólise, preferencialmente os ácidos sulfônicos e sulfúricos. Estes catalisadores fornecem alto rendimento em ésteres alquílicos, mas a reação é lenta, requerendo normalmente temperaturas de 100°C e mais de três horas para completa conversão. No entanto, a catálise ácida é eficiente para óleos que possuem índices de acidez superiores a 1%, tais como os óleos utilizados em frituras. Estes óleos possuem grandes quantidades de ácidos livres que não podem ser transformados em biodiesel via catálise alcalina porque, estando livres, reagem rapidamente com o catalisador produzindo sabões que inibem a separação entre o éster e a glicerina nas etapas de lavagem com água. Contaminações com catalisadores ácidos residuais também podem atacar as partes metálicas do motor, causando a corrosão

e, por isso, devem ser eliminados completamente do produto final (VAN GERPEN e KNOTHE, 2005).

Por outro lado, as reações catalisadas por álcali são mais rápidas do que as conduzidas em meio ácido (MA e HANNA, 1999; VAN GERPEN e KNOTHE, 2005). Além disso, o catalisador alcalino é menos corrosivo e exige menores razões molares entre o álcool e o óleo vegetal. No entanto, ainda que represente a rota tecnológica mais utilizada para a produção de biodiesel, o emprego de NaOH ou KOH exige que a matéria-prima apresente baixa acidez (menor do que 1mg de KOH/g de amostra) para evitar o consumo improdutivo de álcali e a subsequente formação de sabões. O mecanismo proposto para esta reação (Figura 5) constitui-se de uma seqüência de três reações reversíveis, nas quais diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos são formados como intermediários (SCHUCHARDT et al., 1998).

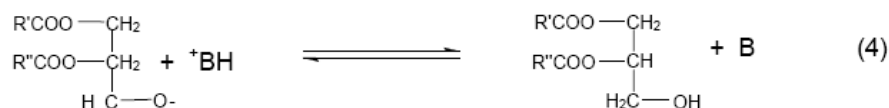
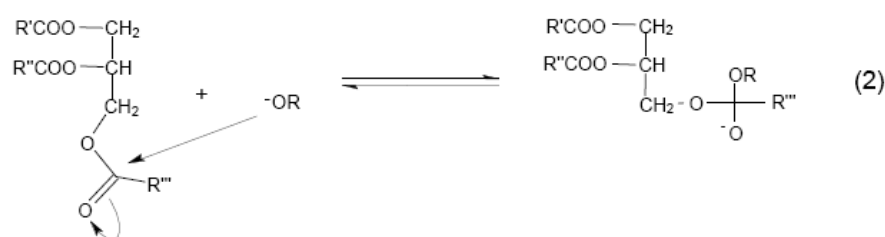


Figura 5 – Mecanismo da reação de transesterificação dos triacilglicerídeos. Fonte: Adaptado de SCHUCHARDT et al., 1998.

Uma desvantagem adicional dessa rota tecnológica é formação de água no meio reacional, decorrente da pré-solubilização dos hidróxidos no álcool (e.g., etanol) para a produção do alcóxido correspondente (e.g., etóxido de sódio), que atua como o

verdadeiro catalisador da transesterificação. A presença de água favorece, inevitavelmente, a saponificação (Figura 6) dos triacilglicerídeos paralelamente a sua conversão em ésteres, gerando dificuldades na purificação, formação de emulsões e perdas de rendimento (ZAGONEL, PERALTA-ZAMORA e RAMOS, 2003; KUCEK, 2004).

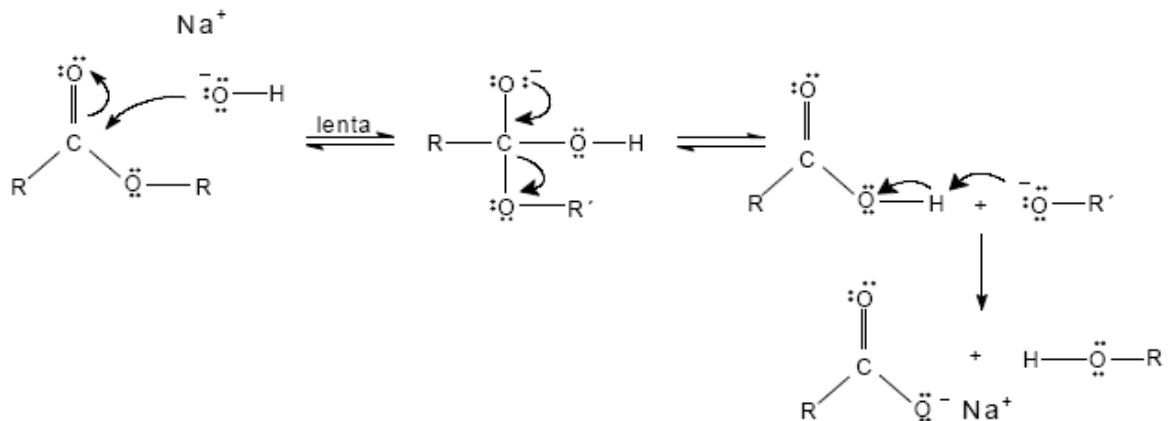


Figura 6 – Mecanismo da reação de saponificação de triacilglicerídeos.

Fonte: Adaptado de ZAGONEL, PERALTA-ZAMORA e RAMOS, 2003; KUCEK, 2004.

### 3.2.3.4 Aplicação de lipases na produção de biodiesel

Embora os processos de transesterificação enzimática para obtenção de biodiesel ainda não sejam comercialmente desenvolvidos, novos resultados tem sido reportados em artigos e patentes (SERCHEL e VARGAS, 1998). De um modo geral, estes estudos envolvem a otimização das condições de reação (solvente, temperatura, pH, tipo de microrganismo que gera a enzima, etc), a fim de estabelecer as características para aplicações industriais. Contudo, tanto o rendimento como o tempo de reação ainda são desfavoráveis em comparação com o sistema de reação por catálise básica.

A alcoólise do óleo de girassol com as lipases livres de *Pseudomonas fluorescens*, *Mucor miehei* e *Candida sp*, foi investigada por Mittelbach (1990) com o propósito de otimizar condições para obtenção de ésteres metílicos e etílicos. Nesse estudo, foi verificada a eficiência da alcoólise com metanol, etanol, n-propanol, n-butanol e n-pentanol, em diferentes condições. Foi também investigada a importância da presença do solvente e da adição de água na reação. O melhor rendimento (89%),

foi obtido na reação de transesterificação com a lipase de *Pseudomonas sp* com etanol, à 45°C. Os demais resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Rendimentos dos ésteres (%) obtidos através da reação de transesterificação enzimática do óleo de girassol com e sem solvente. Fonte: Adaptado de Mittelbach (1990).

	Alcoóis	Lípases		
		<i>P. fluorescens</i>	<i>Mucor miehei</i>	<i>Candida sp</i>
Com solvente	MeOH	79	25	53
	EtOH (96%)	89	82	79
	n-PrOH	81	80	29
Sem solvente	MeOH	3		
	EtOH (anidro)	70		
	EtOH(96%)	82		
	n-ButOH	76		

Na alcoólise do óleo de girassol com etanol sem solvente, Mittelbach (1990) obteve o melhor rendimento (82%) com a lipase de *Pseudomonas sp*. A ausência de solvente foi considerada por facilitar aplicações técnicas, mas em função da viscosidade do óleo, foi necessária vigorosa agitação e um longo tempo de reação (14 h).

A produção de biodiesel a partir de sebo bovino e de óleos de colza, oliva e soja foi investigada por Nelson, Foglia e Marmer (1996) utilizando as enzimas imobilizadas de *Mucor miehei* (lipozyme) e *Candida antarctica* (SP-435), além das de *Geotrichum candidum*, *Pseudomonas cepacia* e *Rhizopus delemar* na forma livre. A reação de transesterificação foi feita com alcoóis de cadeias curtas, em hexano sob agitação constante, e os produtos foram analisados por cromatografia gasosa. A reação com metanol, etanol, propanol e isobutanol foi realizada por 5 horas, nas temperaturas entre 35 e 55°C. Rendimentos acima de 90% foram obtidos com o sebo e todos os alcoóis citados com a lipase de *Mucor miehei*. Além deste, os óleos de soja e colza apresentaram resultados satisfatórios, Tabela 5.

Tabela 5 – Rendimentos dos ésteres (%) obtidos através da reação de transesterificação enzimática de triglicerídeos com alcoóis primários e secundários. Fonte: Adaptado de Nelson, Foglia e Marmer (1996).

	Alcoóis	Lípases		
		<i>Mucor miehei</i>	<i>C. Antarctica</i>	<i>P. cepacia</i>
<b>Sebo</b>	<b>MeOH</b>	<b>94,8</b>	<b>25,7</b>	<b>13,9</b>
	<b>EtOH (95%)</b>	<b>98,3</b>	<b>/</b>	<b>13,7</b>
	<b>EtOH(anidro)</b>	<b>68,0</b>	<b>/</b>	<b>/</b>
	<b>I-PrOH</b>	<b>24,3</b>	<b>61,2</b>	<b>44,1</b>
	<b>2-BuOH</b>	<b>19,6</b>	<b>83,8</b>	<b>41,0</b>
<b>Soja</b>	<b>MeOH</b>	<b>75,4</b>	<b>/</b>	<b>14,5</b>
	<b>EtOH</b>	<b>97,4</b>	<b>/</b>	<b>/</b>
<b>Colza</b>	<b>MeOH</b>	<b>77,3</b>	<b>/</b>	<b>/</b>

A transesterificação do óleo de colza com 2-etil-1-hexanol com lipases na ausência de solvente orgânico foi estudada por Linko et al.(1994), que testaram várias enzimas comerciais disponíveis e o melhor resultado foi obtido com lipase de *Candida rugosa* (CRL). A condição ótima de transesterificação foi com a razão molar de óleo/álcool (1:2,8), com 1% de adição de água, 14,6% de lipase e 1 hora de reação.

A estabilidade e dispersibilidade de lipases nativas em solvente orgânico são menores que em água. Para melhorar estes parâmetros, Murakami, Kawasaki e Kawanari (1997) ligaram covalentemente o grupo acila p-dimetilsulfôniofeniléster ao grupo amino do resíduo da lisina da lipase de *Phycomyces nites*. A velocidade da reação de transesterificação em meio orgânico foi quase 40 vezes maior em relação à lipase nativa.

Segundo Osterberg, Blomstrom e Kolmberg, (1993), a reação de transesterificação de uma série de triglicerídeos insaturados com ácido esteárico usando as lipases de *Rhizopus sp* e *Rhizopus delemar*, mostrou que a posição da ligação dupla, e não o grau de insaturação, é o fator decisivo na velocidade da reação. Por exemplo, a ligação dupla da posição g do ácido linolénico inibe a reação.

A síntese do butirato de citronelila e caproato de geranila por transesterificação com lipases de *Pseudomonas sp.*, foi estudada por Yee, Akoh e Phillips (1997). Os parâmetros da reação investigados foram a quantidade de enzima, o efeito da concentração do substrato, a adição de água, temperatura, tempo de reação, solvente orgânico, pH e reutilização do biocatalisador. Os melhores rendimentos (96 a 99%) foram obtidos com o uso de 15% da enzima em relação aos reagentes. O aumento da concentração do álcool terpênico inibiu a atividade da lipase, enquanto que o acréscimo do grupo acil doador (triacilglicerol) aumentou a concentração do éster produzido. Os melhores rendimentos foram obtidos nas temperaturas entre 30 a 50°C, após 24 horas de reação e em pH próximo a 7. A adição de quantidade superior a 2% de água diminuiu o rendimento dos respectivos ésteres.

A relação das atividades hidrolíticas, esterificação e transesterificação foi investigada com nove lipases comerciais por Wu, Jaaskelainen e Linko (1996). Usando óleo de oliva e de colza, os autores reportaram que há uma correlação direta entre estas atividades. Assim, de acordo com os resultados obtidos, a atividade hidrolítica da lipase pode ter pouco valor na predição da atividade sintética. Ao contrário, a lipase pode não exibir atividade sintética, mas pode apresentar alta atividade hidrolítica.

Segundo Cernia, Palocci e Soro (1998) a natureza do meio reacional, influencia a atividade de lipases microbianas em reações de esterificação e transesterificação, empregando substratos naturais e compostos sintéticos com relação à velocidade de reação e a enantiosseletividade. Dados experimentais obtidos demonstraram que quando não há correlação substancial entre enantiosseletividade e algumas características físico-químicas do solvente, como hidrofobicidade e constante dielétrica, a polaridade e a hidrofobicidade são capazes de modular a atividade da lipase. De acordo com Costa e Amorim (1999) o efeito da hidrofobicidade de solventes sobre a enantiosseletividade de biotransformações tem sido analisado em termos de partição das moléculas de água presente nas cavidades do sítio ativo da enzima, ou dos grupos funcionais do substrato.

---



## ***4. MATERIAL E MÉTODOS***

### **4.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PESQUISA**

Este trabalho de pesquisa foi desenvolvido no Laboratório de Saneamento do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo (CT-UFES), localizado no Campus Universitário de Goiabeiras – Vitória – ES; e envolveu três etapas: 1) isolamento e caracterização de bactérias lipolíticas, 2) avaliação da atividade lipolítica das cepas bacterianas isoladas em resíduos oleosos e/ou gordurosos líquidos, através do método de espectrofotometria, e, 3) monitoramento da biodegradação aeróbia e da atividade lipolítica de cepas bacterianas selecionadas liofilizadas, e de uma lipase comercial, sobre quatro tipos de resíduos oleosos e/ou gordurosos (escuma da caixa de gordura da ETE, escuma da caixa de gordura do restaurante universitário (UFES), lodo UASB (ETE-UFES) adicionado de 5% de óleo de soja comercial (Liza<sup>®</sup>) e óleo de fritura), oriundos do saneamento, através das técnicas de respirometria aeróbia e determinação do teor de óleos e graxas, respectivamente.

### **4.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS OLEOSOS E GORDUROSOS**

Os parâmetros físico-químicos analisados foram: pH, Umidade, DQO total, DBO<sub>5</sub>, Sólidos Voláteis e Óleos e Graxas (O&G) segundo as metodologias descritas no “Standard Methods for the Examination of Water and Waster” (APHA, 1995) e encontram-se referenciadas na Tabela 6. O percentual de óleo de soja utilizado no lodo UASB foi de 5% em volume. Para avaliar a DBO<sub>5</sub> do óleo de fritura, substrato que não possuía oxigênio suficiente e nem microrganismos, foi necessário além da diluição e introdução de nutrientes, adicionar "semente", ou seja, uma porção de esgoto com DBO<sub>5</sub> conhecida para corrigir o resultado final.

Tabela 6 – Resumo de metodologias das análises físico-químicas.

VARIÁVEIS	MÉTODOS	REFERÊNCIA
DQO (total)	Oxidação por dicromato de potássio em meio ácido	STANDARD METHODS 5220 D, 1995
DBO <sub>5</sub>	Método respirométrico	STANDARD METHODS 5210 D, 1995
O&G	Método de extração por solvente	STANDARD METHODS 5520-D, 1995
ST	Método gravimétrico	STANDARD METHODS 2540, 1995
SV	Método gravimétrico	STANDARD METHODS 2540, 1995
pH	Método eletrométrico	STANDARD METHODS 4500-H <sup>+</sup> B, 1995

### 4.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE LIPOLÍTICAS

As bactérias foram obtidas a partir de amostras de espuma coletadas de caixas de gordura residencial e do restaurante universitário da UFES. Preliminarmente ao isolamento procedeu-se o enriquecimento bacteriano, conforme descrito por Semionato (2006), com modificações.

#### 4.3.1 Enriquecimento e isolamento de bactérias potencialmente lipolíticas

Uma alíquota de 10 g de espuma foi transferida para Erlenmeyer de vidro de 250 mL, contendo 5 mL de óleo de soja comercial (Liza<sup>®</sup>) e 50 mL de um meio de cultura. O meio de cultura foi preparado em um frasco de um litro: 1,0 mL de fungicida comercial Nistatina (Micostatin, B-MS, EUA); 1,0 g NaCl (Synth, Brasil); 5,0g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Synth, Brasil); 6,2g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Synth, Brasil); 0,9g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Synth, Brasil); 0,3g MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O (Synth, Brasil); e óleo de soja comercial (Liza<sup>®</sup>) como fonte de carbono (5% v/v). Essas amostras foram incubadas por 120 horas em temperatura de 30°C em agitador de mesa a 120 rpm.

Para o isolamento das bactérias, 10 µL do material enriquecido foram transferidos para placa de Petri contendo 20 mL do meio de cultura mínimo solidificado com o acréscimo de 15g de Agar-Agar (Merck, Alemanha), 0,1% v/v do fungicida nistatina (Micostatin, B-MS, EUA) e óleo de soja (5%, Liza<sup>®</sup>) emulsificado com 1% v/v de

Tween 80 (Vetec, Brasil). As placas foram mantidas em estufa a 30°C por um período de 96 horas.

As colônias de bactérias desenvolvidas nas placas após este período que apresentaram tipos morfológicos distintos (cepas) foram repicadas várias vezes até obter-se o isolamento de cada cepa. Para a inoculação das bactérias isoladas, foi utilizado o método de esgotamento em estrias e, após preparadas, as placas foram incubadas por 72 a 96 horas a uma temperatura de 30°C, segundo metodologia adaptada de Sugimori, Nakamura e Mihara (2002). Em seguida, cada cepa isolada foi transferida para tubos de ensaio inclinados com tampa plástica, contendo o mesmo meio de cultura utilizado nas placas de Petri e armazenados sob refrigeração a 5°C.

#### 4.3.2 Seleção de bactérias lipolíticas pelo método de Rodamina-B

As bactérias isoladas anteriormente foram inoculadas em placas de Petri com meio mínimo sólido contendo fungicida comercial Nistatina, emulsão óleo e Tween 80 (Vetec, Brasil) e indicador Rodamina B (C.I. 45170 – Synth, Brasil) a 10mg/mL a 30°C por 24 a 48 horas. O método de Rodamina B evidencia bactérias lipolíticas através da presença da enzima extracelular lipase (HABA et al., 2000). Após este período, as colônias de bactérias foram submetidas à luz U.V. (Spectroline model EA – 160 EUA) de 350 nm. As que apresentaram um halo de coloração laranja-fluorescente formado ao redor das colônias foram identificadas como bactérias lipolíticas, evidenciando a produção de lipase extracelular que degrada lipídeo.

As colônias bacterianas também foram submetidas ao teste de Gram (SILVA, 1999), testes bioquímicos de catalase, coagulase, indol e vermelho de metila (Reagen, Brasil), conforme Silva (1999) para sua caracterização, e foram em seguida submetidas à avaliação lipolítica através do método espectrofotométrico (WINKLER e STUCKMANN, 1979).

#### 4.3.3 Caracterização bioquímica dos isolados bacterianos

As colônias bacterianas foram submetidas ao teste de Gram, testes bioquímicos de catalase, coagulase, indol e vermelho de metila (Reagen, Brasil), todos conforme Silva (1999). Estes testes foram realizados com a finalidade caracterizar as cepas

---

bacterianas e permitir a classificação por chaves de identificação para diferenciar/caracterizar as cepas isoladas.

#### 4.3.3.1 Método de Gram

Para cada cepa foi feito um esfregaço homogêneo em uma lâmina, o qual depois de seco foi fixado na chama do bico de Bunsen. O esfregaço foi corado por cerca de 1 minuto com solução de cristal violeta (Laborclin, Brasil) e em seguida lavado com água corrente. Cobriu-se o esfregaço com solução de lugol (Laborclin, Brasil) por cerca de 1 minuto e depois se lavou com água corrente. O esfregaço foi descorado com solução de etanol + acetona 50% v/v (Laborclin, Brasil) e novamente lavado com água corrente. Por último foi feita a coloração com safranina (Laborclin, Brasil) por 1 minuto e lavagem final com água corrente. Após a secagem, observaram-se as lâminas em objetiva de 40 no Microscópio Meiji (ML7100, Japão). As bactérias que fixam o composto iodo-pararosanilina formado pela violeta de genciana (cristal violeta) e o lugol são denominadas gram-positivas. As bactérias que não fixam o composto e deixam-se descorar pela solução descorante se apresentando posteriormente coradas por safranina, recebem o nome de gram-negativas.

#### 4.3.3.2 Teste de Vermelho de Metila (V.M.)

Para esse teste foram dissolvidos 7,0g de Peptona (Oxoid, Brasil), 5,0g de Dextrose (Reagen, Brasil) e 5,0g de Hidrogenofosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$  – Quimex, Brasil) em 1L de água destilada até completa dissolução. Distribuiu-se cerca de 8 mL da solução por tubos de ensaio que em seguida foram autoclavados (15min/121°C). O cultivo puro foi semeado por meio de alça de inoculação e incubado por 48h-120h a 37°C. O indicador de pH vermelho de metila foi preparado pela dissolução de 0,1g de vermelho de metila (Reagen, Brasil) em 300 mL de álcool etílico 95% (QM, Brasil) e 200 mL de água destilada. Ao final, 5 gotas da solução de vermelho de metila foram adicionadas aos tubos contendo o crescimento bacteriano de, no mínimo, 48 horas. A cor resultante foi interpretada imediatamente: teste positivo para formação de cor vermelha na superfície do meio ( $pH \leq 4,4$ ) e teste negativo para coloração amarela no meio de cultura ( $pH \geq 6,0$ ). Este método é útil para testar a habilidade de um microorganismo em produzir ácidos detectáveis a partir da fermentação da

---

glicose, sendo importante na distinção entre bactérias, pois determina a diferença que ocorre na metabolização da glicose entre os microrganismos.

#### 4.3.3.3 Teste de Coagulase conjugada (teste em lâmina)

A lâmina de vidro foi dividida ao meio com lápis dermatográfico. Uma parte colocou-se 1 gota de água destilada e na outra, 1 gota de plasma de coelho. Em cada uma delas fez-se uma suspensão da amostra da cepa bacteriana. A leitura do teste é imediata e a observação de grumos apenas na metade onde se colocou o plasma indicou a prova positiva, enquanto que em um teste negativo a suspensão bacteriana permanecerá homogênea em ambas as metades.

#### 4.3.3.4 Teste de indol

O teste serve para determinar a habilidade de um microorganismo em formar indol (um metabólito orgânico heterocíclico) a partir do aminoácido triptofano. Foram dissolvidos 2,0g de Peptona (Oxoid, Brasil), 0,5g de NaCl (Synth, Brasil) e 1,0g de L-Triptofano (Merck, Alemanha) em 100 mL de água destilada até a completa dissolução e distribuídos cerca de 4 mL da solução por tubo de ensaio. Esses tubos foram posteriormente autoclavados (15min/121°C). O cultivo puro foi semeado por meio de alça de inoculação e incubado por 24h a 37°C. Adicionou-se, então, cerca de 6 gotas do reativo de Kovac's (Newprov, Brasil) diretamente ao caldo com bactéria em estudo, com pelo menos 24h de incubação prévia a 37°C. Após a adição do reativo, o teste foi interpretado como positivo quando houve a formação de um anel vermelho intenso na camada superior do caldo, e como negativo quando há a formação de um anel amarelo na camada superior do caldo. Pode ocorrer um resultado intermediário de coloração alaranjada na superfície do caldo devido à produção de escatol, um composto metilado o qual pode ser um precursor da formação de indol.

#### 4.3.3.5 Teste de catalase

Uma gota de peróxido de hidrogênio a 10% (v/v) (Cromoline, Brasil) foi depositada numa lâmina de microscópio; uma amostra (uma colônia colhida com uma alça de

---

inoculação) foi então esfregada nessa gota. O aparecimento de bolhas caracteriza o organismo como catalase-positivo, caso contrário, é catalase-negativo. As bolhas são formadas pelo oxigênio molecular libertado na reação da catalase.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE CEPAS BACTERIANAS POR ESPECTROFOTOMETRIA

A atividade lipolítica foi dosada segundo método descrito por Winkler e Stuckmann (1979) utilizando o substrato sintético p-nitrofenil palmitato (p-NPP). O método baseia-se na reação esquematizada na Figura 7, onde o p-nitrofenil palmitato é hidrolisado pela ação da lipase, liberando p-nitrofenol e ácido palmítico. A atividade lipolítica foi determinada através da estimativa do p-nitrofenol liberado, que forma um cromógeno amarelo (íon fenolato) sob condições alcalinas, apresentando  $\lambda$  máximo a 410 nm. O método de hidrólise do p-NPP apresenta vantagens por ser rápido na execução e exigir volumes pequenos de amostra, além da facilidade na execução do ensaio (JAEGER, 1994; JAEGER e EGGERT, 2002; GUPTA, R.; GUPTA, N. e RATHI; SAXENA et al., 2003; WINKLER e STUCKMANN, 1979).

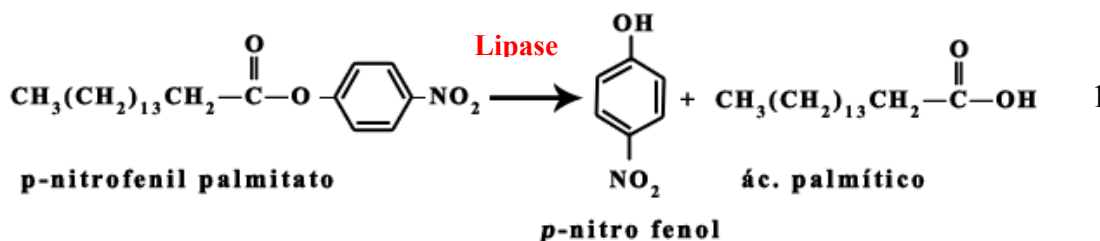


Figura 7 – Reação de hidrólise do p-nitrofenil palmitato e a formação do cromogênico fenolato.

A dosagem de proteínas totais foi realizada de acordo com o método de (Bradford, 1976), que se baseia nos princípios básicos da fotolorimetria estabelecidos por Lambert e Beer. O método de Bradford é muito difundido por ser rápido e bastante sensível, e foi utilizado nesta pesquisa com a finalidade de expressar a atividade lipolítica por miligramas de proteína (atividade específica).

#### 4.4.1 Estruturação do experimento

Neste experimento foram utilizadas as cepas bacterianas que obtiveram resultados positivos do teste de Rodamina B. O substrato oleoso utilizado foi óleo de soja (Liza<sup>®</sup>). As cepas foram inoculadas em 50 mL de meio de cultura mínimo líquido com óleo de soja comercial (5% em v/v), contidos em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Os frascos foram submetidos à agitação de 120 rpm, sob temperatura de 28°C. O período total de incubação foi de 120 horas. Para as análises, a mesma cepa foi inoculada em dois Erlenmeyers, e de cada um foram coletadas três amostras (triplicata). Decorrido o período de incubação bacteriana para as análises, uma amostra de 1 mL foi colocada em eppendorf estéril e centrifugada a 15000 g, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido, denominado de extrato protéico, foi utilizado para dosagem de proteínas e atividade enzimática.

A estruturação do experimento de avaliação da atividade lipolítica é apresentada no fluxograma da Figura 8 a seguir.

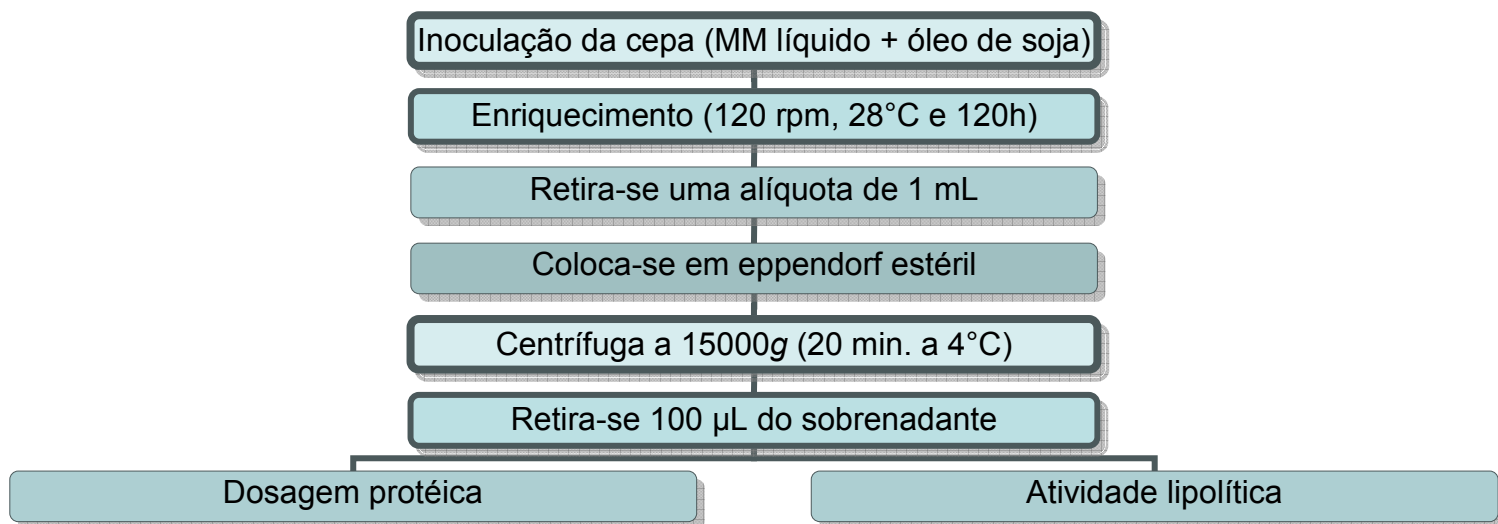


Figura 8 – Fluxograma de delineamento experimental para avaliação da atividade lipolítica.

#### 4.4.2 Quantificação de proteína por método de Bradford

O reagente de Bradford foi preparado com 100 mg do corante Coomassie Blue G250 (Merck, Alemanha) em 50 mL de etanol a 95% (QM, Brasil). Essa solução foi

misturada com 100 mL de ácido fosfórico 85% (Vetec, Brasil) e diluída com 1 L de água destilada. O reagente foi então filtrado com papel de filtro Whatman nº. 1. Para elaborar a curva-padrão foi utilizada a solução estoque de soro de albumina bovina (BSA, Sigma, EUA) numa concentração de 1 mg/mL em água destilada esterilizada. Para a curva de calibração, foram pipetados volumes de 10, 20, 40, 60, 80, e 100 µL da solução padrão de BSA em tubos de ensaio, completando-se com água destilada até 100 µL. O ensaio foi realizado em 3 repetições amostrais. Em seguida, adicionou-se 5 mL de reagente de Bradford a cada tubo de ensaio e agitados no vórtex mixer (Vision Scientific co., LTD, VS-1300V, Korea). As amostras e o branco (5 mL de reagente de Bradford e 100 µL de água destilada esterilizada) foram medidas a uma absorbância de 595nm entre 2 minutos e 1 h após a agitação. Para a dosagem protéica das cepas bacterianas foi utilizado 100 µL do extrato protéico no lugar da solução de BSA.

#### 4.4.3 Avaliação da atividade lipolítica

Para a avaliação da atividade lipolítica uma alíquota de 2,4 mL da solução do substrato\* foi pré-incubada em banho termostatizado a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL do extrato protéico. O período de incubação para reação enzimática foi de 15 minutos a 37°C.

(\*) O substrato consiste em duas soluções:

- 1: 30 mg de p-NPP (Sigma, EUA) em 10 mL de isopropanol (Quimex, Brasil).
  - 2: 90 mL de solução tampão fosfato (0,05M, pH 8,0), contendo 207 mg de deoxicolato de sódio (Sigma, EUA) e 100 mg de goma arábica (Synth, Brasil).
- Após as preparações dessas duas soluções e completamente dissolvidas, foram então misturadas.

A atividade lipolítica foi calculada em U (µmol/min) de acordo com a Equação 1, descrita por Rowe e Howard (2002) e expressa por mg de proteína (atividade específica).

$$U(\mu\text{mol}/\text{min}) = \frac{Abs \cdot vol}{\varepsilon \cdot T \cdot p} \quad \text{Eq. 1}$$



Onde:

Abs = Absorbância a 410 nm;

Vol = Volume do ensaio em mL;

$\epsilon$  = Absorvidade molar ( $18,5 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  do p-nitrofenol);

T = Tempo em minutos;

p = miligrama de proteínas dosadas no ensaio de Bradford (1976);

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE CEPAS BACTERIANAS E UMA LIPASE COMERCIAL, ATRAVÉS DO MONITORAMENTO PARALELO DO TEOR DE ÓLEOS E GRAXAS E DA BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DE DIFERENTES RESÍDUOS OLEOSOS ORIUNDOS DO SANEAMENTO AMBIENTAL.

Os ensaios de biodegradabilidade foram avaliados por meio da produção acumulada de  $\text{CO}_2$  e decaimento de óleos e graxas. As cepas bacterianas selecionadas para o sistema respirométrico foram às cepas C1, B1, R1 e a cepa bacteriana obtida de um produto comercial de origem japonesa (J). As cepas C1 e B1 apresentaram atividade lipolítica alta, R1 média e J baixa. Os resíduos oleosos denominados RU (restaurante universitário), EE (resíduo da ETE-UFES), OF (óleo de fritura) e LU (lodo UASB) foram combinados com as bactérias C1, B1, R1 e J, separadamente, a fim de verificar a aplicação destas metodologias como forma de avaliação da atividade lipolítica.

##### 4.5.1 Características e preparação do substrato do Sistema de Respirometria Aeróbia

O substrato foi composto de uma mistura de areia e vermiculita em uma proporção 1:1 em volume, a fim de simular um solo aerado no sistema. A areia foi passada pela peneira de malha 2 mm (ABNT), lavada por uma solução de HCl 0,1M e posteriormente lavada repetidas vezes com água corrente. Após a lavagem foi feita a secagem em estufa ( $100^\circ\text{C}$ , por 6 horas) e esterilização em autoclave (15min/ $121^\circ\text{C}$ ). A vermiculita foi lavada em água corrente, seca em estufa ( $100^\circ\text{C}$ , por 6 horas) e depois autoclavada (15min/ $121^\circ\text{C}$ ) para esterilização. Foi utilizado meio mínimo líquido (M.M.L) para ajustar o substrato a 50% da capacidade de campo.

---

#### 4.5.2 Preparação dos resíduos oleosos

Os resíduos oleosos utilizados nos experimentos como fonte de matéria orgânica foram: Escuma da caixa de gordura da ETE, escuma da caixa de gordura do restaurante universitário (UFES), lodo UASB (ETE-UFES) adicionado de 5% de óleo de soja comercial (Liza<sup>®</sup>) para igualar o teor de O&G dos demais resíduos, e óleo de fritura de origem doméstica, reutilizado apenas 3 vezes, à temperatura de aproximadamente 170°C, no preparo de alimentos. Os resíduos oleosos foram levados à estufa a 60°C para atingirem o mesmo teor de O&G pelo processo de secagem. O óleo de fritura foi adicionado de água e Tween 80 visando a padronização da concentração de O&G.

#### 4.5.3 Preparação das cepas bacterianas e da enzima comercial para o experimento de biodegradação aeróbia

As cepas foram inoculadas em 200 mL de meio de cultura mínimo líquido com 10 mL de óleo de soja comercial (Liza<sup>®</sup>). O enriquecimento foi realizado no agitador de mesa a 120 rpm durante 120 horas e mantido à temperatura de 28°C. Após o período de incubação, uma alíquota de 15 mL foi transferida para tubos tipo Falcon de 50 mL estéreis. Com a finalidade de permitir a pressurização da amostra no interior dos tubos Falcon, a tampa destes foi perfurada. Os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e posteriormente levados ao Liofilizador (Labconco Freezone<sup>®</sup>, modelo 7752020, EUA), onde permaneceram por um período de 30 horas. Depois de liofilizadas as cepas foram conservadas sob refrigeração a temperatura de 4 °C. As cepas liofilizadas foram adicionadas a vermiculita em pó, utilizada como veículo de inoculação, numa proporção de 10<sup>7</sup> UFC/g de vermiculita. A solução com a lipase comercial AK Amano 20 (Amano Co., Japão) foi adicionada aos tratamentos diluída em água destilada estéril para obter uma concentração 5 mg/mL.

#### 4.5.4 Processo de biodegradação aeróbia, por respirometria.

---

O fluxograma do delineamento experimental no Sistema de respirometria aeróbia pode ser visualizado na Figura 9.

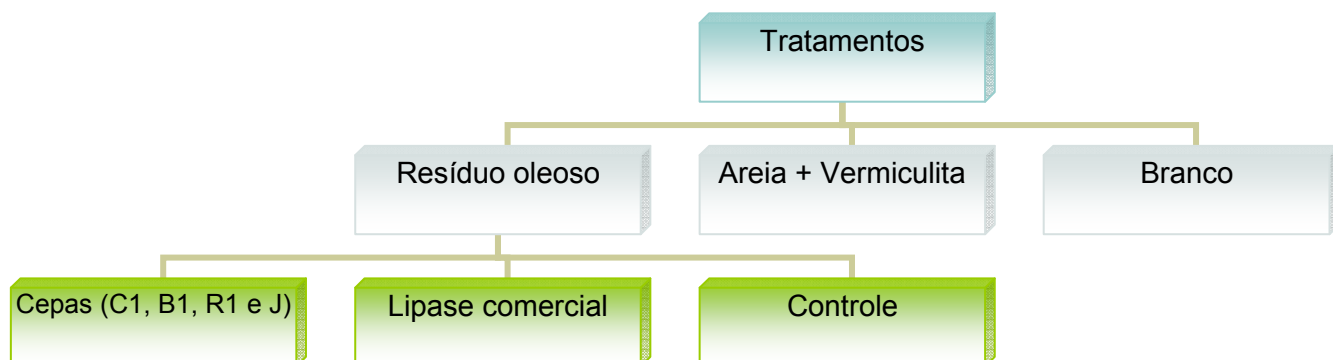


Figura 9 – Fluxograma de delineamento experimental para o Sistema de respirometria aeróbia.

O Sistema de Respirometria Aeróbia foi estruturado da seguinte forma: amostras de 100g da mistura areia-vermiculita foram adicionadas de 20 mL meio mínimo líquido, 1g da mistura vermiculita em pó com as cepas bacterianas liofilizadas e 10g de resíduos oleosos equiparados na concentração de O&G. Estes materiais foram colocados em potes plásticos herméticos (900 mL) e incubados no escuro por um período de 30 dias, à temperatura média de 28°C. Para cada tratamento foram preparados controles contendo apenas o resíduo oleoso, areia e vermiculita. Havia outros dois frascos no experimento, um branco (frasco contendo somente com NaOH), necessário para verificar se os potes utilizados eram realmente herméticos e um frasco com areia e vermiculita, para avaliar se havia produção de CO<sub>2</sub> no substrato. Todos os tratamentos e os controles possuíram 3 repetições experimentais. O experimento foi composto no total por 78 unidades experimentais (Figura 10).



Figura 10 – Experimento de incubação composto por 78 unidades experimentais.

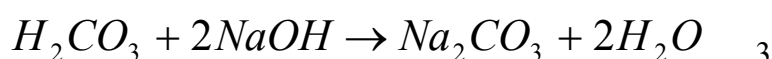
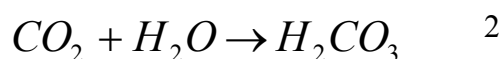
#### 4.5.5 Avaliação do CO<sub>2</sub> produzido

A quantificação da degradação foi adaptada de acordo com o método proposto pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 1990). Essa norma propõe a captura do CO<sub>2</sub> produzido pela respiração bacteriana utilizando uma solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) 0,50 mol/L e posterior quantificação pelo método titulométrico. Entretanto, nos ensaios realizados neste estudo foi feita a quantificação do CO<sub>2</sub> por meio de leitura de condutividade elétrica (Rodella e Saboya, 1999) após a troca periódica da solução de NaOH contida no interior dos potes. Para cada tratamento foi utilizado um pequeno frasco de polietileno de 50 mL contendo 20 mL de solução de NaOH 0,5 mol/L para a absorção do CO<sub>2</sub> no interior do pote. A solução de NaOH contida no interior dos frascos de plástico era trocada periodicamente por uma nova solução de NaOH para a captura de CO<sub>2</sub> durante um período pré-estabelecido.

A captura de CO<sub>2</sub> na solução de NaOH e a posterior quantificação foram realizadas a cada 24h na primeira semana, e com 48h após esse período, durante 30 dias de incubação. Os dados de CO<sub>2</sub> produzido foram acumulados ao longo do período de incubação de forma a obter-se a curva de degradação dos resíduos. A quantidade em miligramas de CO<sub>2</sub> absorvido (mg) foi calculada pela expressão da Equação 2 (Rodella e Saboya, 1999):

$$CO_2(mg) = V \cdot M \cdot 22 \cdot \frac{[C_1 - C_x]}{[C_1 - C_2]} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde: V é o volume da solução de NaOH em mL empregada na absorção do CO<sub>2</sub> e M, sua concentração em mol/L; C<sub>1</sub> é a medida da condutividade elétrica da solução padrão de NaOH em mS/cm; C<sub>x</sub> é a medida da condutividade elétrica da amostra (mS/cm) e C<sub>2</sub> é a medida da condutividade elétrica do Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (mS/cm). A condutividade elétrica do Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> foi obtida a partir da condutividade da solução padrão de NaOH de acordo com as seguintes reações:



As medidas de condutividade elétrica foram realizadas em condutímetro marca Jenco, modelo 1671, China. A Figura 11 mostra o esquema com as reações que ocorrem no sistema respirométrico.

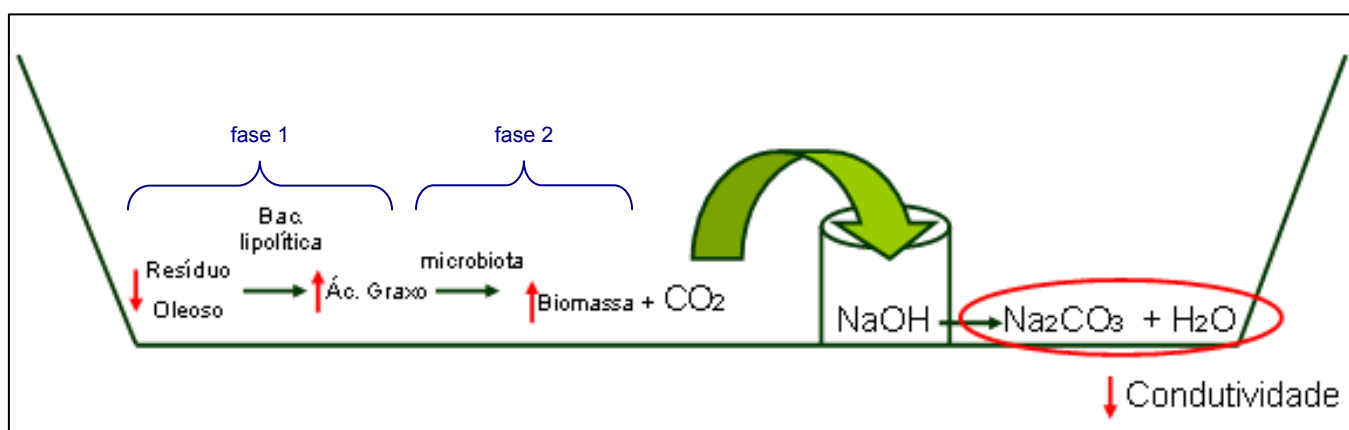


Figura 11 – Esquema com as reações que ocorrem no sistema de respirometria aeróbia.

A degradação dos O&G do resíduo oleoso pelas bactérias lipolíticas inoculadas liberam ácidos graxos (fase 1), que são prontamente assimilados pela microbiota do resíduo (fase 2). Parte desta assimilação é convertida em biomassa e outra parte é degradada na respiração para a obtenção de energia e manutenção de funções vitais dos microrganismos. Os frascos com uma solução de NaOH fazem a captura

do CO<sub>2</sub> liberado no processo de respiração da biomassa microbiana, ocorre uma diminuição na condutividade da solução de NaOH que permite inferir o aumento da população microbiana. A Figura 12 mostra os potes plásticos herméticos contendo areia, vermiculita, resíduo oleoso e o inóculo específico (10<sup>7</sup> UFC) no dia 0 e após 30 dias de experimento.

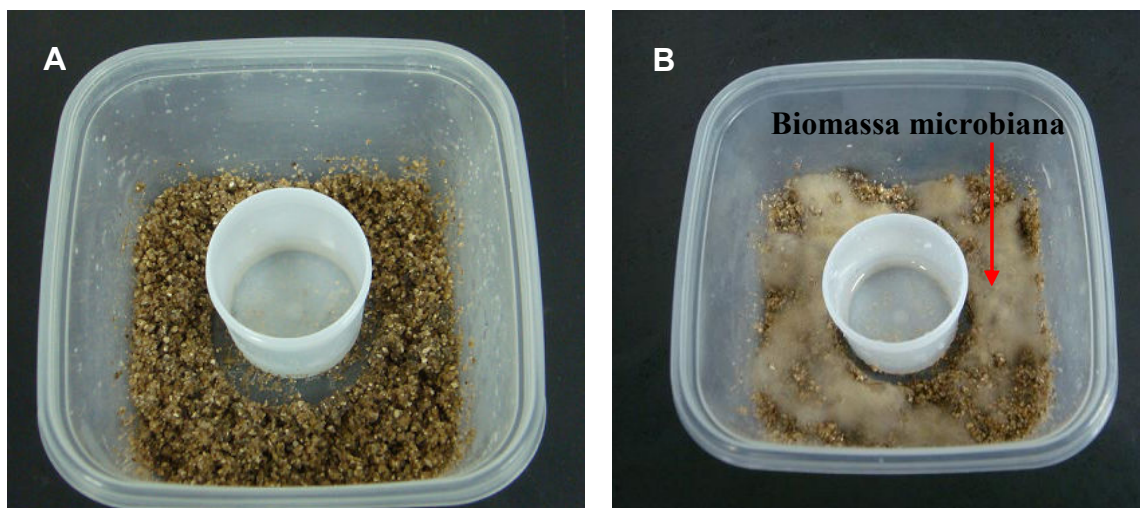


Figura 12 – Potes de plástico herméticos de 900 mL e frascos de polietileno de 50 mL para solução de NaOH. Escuma da caixa de gordura da ETE inoculado com a cepa J liofilizada no dia 0 (A) e aos 30 dias de experimento verifica-se elevada presença de biomassa microbiana (B).

#### 4.5.6 Avaliação do teor de óleos e graxas, durante o processo de biodegradação aeróbia por respirometria.

O decaimento de O&G foi aferido com uma alíquota de 2g dos resíduos contidos nos potes de biodegradação. Os potes utilizados nesta etapa foram réplicas dos tratamentos para não interferir nos resultados de respirometria. Outros parâmetros físico-químicos analisados foram o pH e SV. As técnicas utilizadas obedeceram aos procedimentos estabelecidos pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – 19ª edição. Na extração de óleos e graxas foi empregada a técnica clássica Soxhlet (Extrator de óleos e graxas MA 491, Marconi), a qual é chamada de extração exaustiva, pois o solvente passa muitas vezes pela amostra (Figuras 13 e 14). Durante a análise, um sistema de sifonamento removeu o extrato para o solvente por meio de ciclos, sendo uma extração contínua realizada em 2

horas. Esse tipo de extração foi aplicado a analitos que foram estáveis à temperatura de evaporação do solvente (SKOOG, WEST e HOLLER, 1996; REEVE, 1994).

Na determinação do óleo e graxa não se mede uma quantidade absoluta de uma substância específica, mas determinam-se quantitativamente as substâncias solúveis no solvente empregado. Quer dizer que são consideradas graxas os ácidos graxos, as gorduras animais, os sabões, as graxas, as ceras, os óleos vegetais e qualquer outro tipo de substância que o solvente consegue extrair de uma amostra acidificada e que não se volatiliza durante a evaporação.

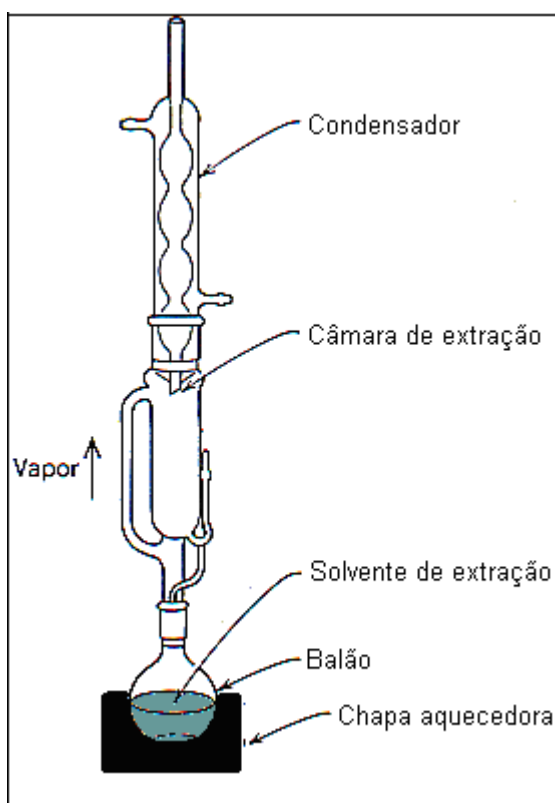


Figura 13 – Esquema da extração em Soxhlet (Fonte: <http://www.qmc.ufsc.br>, 26 jun. 2008).

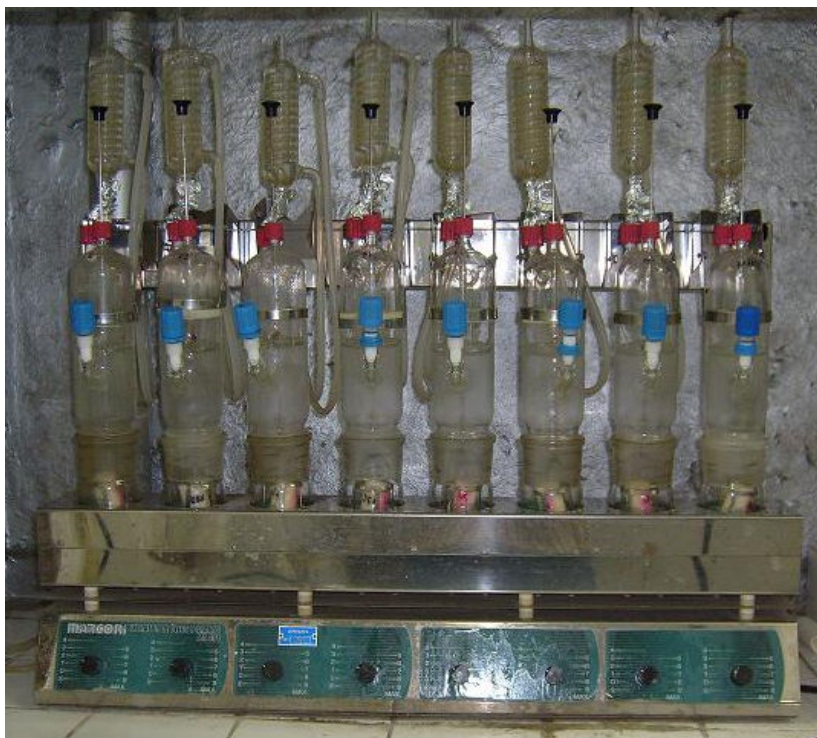


Figura 14 – Extrator de óleos e graxas com capacidade para 8 balões de extração Soxhlet.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram calculadas as estatísticas descritivas (média, desvio-padrão e coeficiente de variação) e elaborados gráficos de média para as variáveis estudadas. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA), denominada teste F ( $\alpha=0,05$ ), dos dados para analisar as variações e significâncias da produção de  $\text{CO}_2$  e do teor de O&G entre os tratamentos, seguida do teste Tukey (5%) para a comparação entre as médias dos tratamentos (SPSS versão 11.5). Os dados de respirometria e O&G foram analisados aos 30 dias, uma vez que os experimentos são cumulativos. As medidas de respirometria foram feitas diariamente na primeira semana e de dois em dois dias a partir do oitavo dia. Os O&G foram avaliados aos 0, 10, 20 e 30 dias. Estes experimentos são inteiramente ao acaso (Ensaio Randômico), nos quais os tratamentos foram designados às unidades experimentais por puro e simples sorteio e a única exigência, para que seja possível adotar este tipo de delineamento, é a similaridade das unidades experimentais em relação à variável que se deseja estudar. Os experimentos realizados nesta pesquisa são denominados de Experimentos Fatoriais, conforme o desenho experimental (Figura 15), onde são estudados os efeitos de dois ou mais tipos de tratamento, ao mesmo tempo. São



ensaios com dois ou mais fatores (tratamentos, neste caso os resíduos oleosos) em dois ou mais níveis (tipo de inóculo) e controle para cada experimento. Esses experimentos foram realizados com o programa Statistica 6.

$$4 \text{Resíduos} \times \begin{pmatrix} 4\text{Cepas} \\ \text{Lipase} \\ \text{Controle} \end{pmatrix} + \text{Branco} + (A + V) + \text{NaOH}$$

Figura 15 - Esquema experimental do Sistema de respirometria aeróbia

Onde: A + V, areia e vermiculita, respectivamente;

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item são apresentados os resultados e a discussão referentes aos ensaios propostos de acordo com os objetivos específicos.

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS RESÍDUOS OLEOSOS E GORDUROSOS ESTUDADOS

Os parâmetros físico-químicos verificados na caracterização dos resíduos oleosos foram: pH, Umidade, DQO total, DBO<sub>5</sub>, Sólidos Voláteis e Óleos e Graxas conforme pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 – Dados físico-químicos dos resíduos oleosos derivados de sistema de tratamento de esgoto.

Resíduo	Umidade(%m/m)	SV (%m/m)	DQO <sub>t</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)	DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)	pH	O&G (g/L)	DQO/DBO
Óleo de fritura	<b>10,02</b>	<b>89,91</b>	180000	80000	<b>4,63</b>	<b>906,70</b>	2,25
Lodo UASB (5% de O. de soja v/v)	92,44	6,34	92000	46000	7,18	38,81	2
Escuma R.U.	97,65	2,23	12500	6100	5,65	33,42	2,05
Escuma ETE	92,56	6,25	<b>205000</b>	<b>95000</b>	5,88	40,80	2,16

O resíduo oleoso proveniente da espuma de ETE apresentou elevadas taxas de DQO<sub>t</sub> e DBO<sub>5</sub>, 205000 e 95000 mg de O<sub>2</sub>/L, respectivamente. Esses resultados indicam que o resíduo da ETE-UFES apresentou grande concentração de matéria orgânica, uma vez que este resíduo é proveniente de esgoto doméstico, e portanto possui uma elevada carga de detergentes, O&G, restos alimentícios e excretas, fatores estes que contribuem para alta demanda química e bioquímica mensurada, e também podem explicar os elevados teores de O&G. O óleo de fritura apresentou a maior taxa de sólidos voláteis (89,91 %m/m), de O&G (906,70 g/L) e menor pH (4,63) e umidade (10,02 %m/m). O pH apresentado pelo óleo de fritura pode ser explicado pela presença de ácidos graxos nesse tipo de amostra, enquanto a umidade foi resultado de resíduos dos alimentos utilizados no processo de fritura.

O efluente gerado no beneficiamento do leite contém uma DQO em torno de 3.000 mg/L (MENDES, CASTRO, e PEREIRA, 2006). Em setores em que há grande produção de queijos e derivados, o valor de DQO é da ordem de 50.000 mg/L (GAVALA et al., 1999). Nesses tipos de efluentes, o teor de lipídeos é superior a 1,5

g/L (HWU et al., 1998). Becker et al. 1999, relata no seu estudo de biodegradação do azeite e tratamento de esgoto rico em lipídeos sob condições aeróbicas, águas residuárias com DQO elevadas, da ordem de 77200 mg O<sub>2</sub>/L.

Oswal et al., (2002) observaram que o efluente de usina de óleo de palma constituída basicamente de resíduos de lignocelulose com uma mistura de carboidratos e óleo continha aproximadamente 250000 mg/L de DQO.

Estudos de águas residuárias provenientes de indústrias alimentícias contêm uma DBO até de 100000 mg/L e DQO de até 130000 mg/L (MADEJÓN et al., 1998). Cammarota, Texeira e Freire (2001) utilizaram águas residuais recolhidas a partir de caixa de gordura de uma cooperativa leiteira e esta apresentava as seguintes características: pH = 2,8-4,8; DQO = 10000-12000 mg/L; DBO<sub>5</sub> = 7000-9000 mg/L; óleos e graxas = 200 - 1200 mg/L.

As principais fontes de geração efluentes contendo lipídeos são indústrias de óleos comestíveis, sorvetes, laticínios, curtumes, matadouros, os efluentes domésticos e de restaurantes, principalmente de “fast food”. Os valores de concentração de lipídeos nesses efluentes podem chegar a 16 g/L de O&G (MENDES, CASTRO, e PEREIRA, 2006). No entanto, a concentração de O&G verificada na presente pesquisa foi mais elevada, pois o resíduo analisado foi a espuma, que possui alto teor de O&G.

Os relatos de literatura sobre que resíduos que tem elevadas concentrações de O&G, geralmente apresentam grandes cargas de matéria orgânica. Isto contribui para o entendimento dos dados obtidos na presente pesquisa.

A relação DQO/DBO dos resíduos oleosos analisados, que mede a fração biodegradável do resíduo, foi em torno de 2. Esta relação indica que aproximadamente 50% dos resíduos têm potencial de biodegradação, e desta forma puderam ser utilizados no S.R.A.

## 5.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS

As bactérias foram obtidas a partir de amostras de espuma coletadas de caixas de gordura residencial e do restaurante universitário da UFES. Uma alíquota de 10 g de espuma foi utilizada no enriquecimento em meio mínimo líquido e óleo de soja e foram isoladas 24 cepas bacterianas por meio de esgotamento em estria. Essas cepas foram submetidas ao teste de Rodamina B, resultando numa seleção de 18

cepas de bactérias lipolíticas especificadas como “C1” a “C8”; “C10” a “C13”; “B1”; “R1”, “R2”, “R4”, “R6”, “R7” e a cepa comercial “J”. Os resultados dos testes bioquímicos e de Gram das cepas bacterianas isoladas e da cepa comercial “J” são apresentados na Tabela 8 a seguir.

---

Tabela 8 – Caracterização de cepas bacterianas obtidas a partir de resíduos oleosos e gordurosos oriundos de caixa de gordura domiciliar e do RU UFES.

Fonte	Cepa	Testes						
		Rodamina	Gram	Forma	V.M.	Indol	Coagulase	Catalase
Cx. de gordura doméstica	C1	+	-	cocos	+	+	-	+
	C2	+	-	bacilos	+	-	-	+
	C3	+	-	bacilos	+	-	-	+
	C4	+	-	bacilos	+	+	+	-
	C5	+	-	cocos	+	-	-	+
	C6	+	-	cocos	+	-	-	+
	C7	+	-	cocos	+	+	-	+
	C8	+	-	cocos	+	-	-	+
	C9	-	-	cocos	-	+	-	+
	C10	+	-	cocos	+	-	-	+
	C11	+	-	cocos	+	-	-	+
	C12	+	-	cocos	-	-	-	+
	C13	+	-	cocos	-	-	-	+
	C14	-	-	cocos	-	-	-	+
	C15	-	-	cocos	-	-	-	+
	C16	-	-	cocos	-	-	-	+
Cx. de gordura do Rest. Universitário da UFES	B1	+	-	cocos	-	-	-	+
	R1	+	-	cocos	+	-	-	+
	R2	+	-	cocos	+	-	-	+
	R3	-	-	cocos	-	-	-	+
	R4	+	-	cocos	-	+	-	+
	R5	-	-	cocos	-	-	-	+
	R6	+	-	cocos	+	+	-	+
R7	+	-	cocos	+	+	-	-	
Cedida	J	+	-	bacilococos	+	-	-	+

Obs.: A cepa J cedida é referenciada por SUGIMORI, NAKAMURA e MIHARA (2002).

As bactérias de caixa de gordura doméstica apresentaram maior biodiversidade em relação às isoladas do restaurante universitário. Todas as cepas bacterianas observadas foram gram negativas e somente duas cepas foram negativas para o teste de catalase (C4 e R7). Semionato (2006), que isolou bactérias de espuma de caixa de gordura (ETE - UFES), obteve em sua maioria bactérias gram negativas, e todas positivas para o teste de catalase, resultados similares aos desta pesquisa. Segundo a literatura, a maioria das bactérias lipolíticas encontradas na natureza são gram negativas (KANWAR e GOSWAMI, 2002, OGINO et al., 1994, WILHELM et al, 1999). Ou seja, as bactérias lipolíticas, independentemente da fonte, são na maior parte gram negativas e catalase positiva. Quanto a estrutura física, somente as cepas C2, C3 e C4 se apresentaram na forma de bacilos.

As bactérias lipolíticas gram negativas do gênero *Pseudomonas* apresentam grande produção de lipase extracelular e conseqüentemente alta eficiência catalítica (DHARMSTHITI e KUHASUNTISOOK, 1998; HABA et al., 2000; JAEGER e EGGERT, 1994). Algumas bactérias lipolíticas gram positivas, tais como os gêneros: *Clostridium*, *Bacillus* e *Staphylococcus*, a atividade lipolítica dessas bactérias foi menos expressiva que a das bactérias gram negativas (WAKELIN e FORSTER, 1997; ROUSENAU e JAEGER, 2000; JAEGER e EGGERT, 1994).

Segundo Koneman et al. (1997), a maioria das bactérias coco gram negativo são catalase positiva e coagulase negativa e, neste estudo apenas a cepa C4, que é um bacilo, foi positiva para coagulase, critério aceito de uma forma geral para a identificação de bactérias patogênicas. Quanto ao teste da catalase (teste de aerobiose) que demonstra a capacidade das células converterem peróxido de hidrogênio em água e oxigênio gasoso, somente as cepas C4 e R7 foram negativas, o que indica que estas cepas são anaeróbias ou anaeróbias facultativas, ou seja, isso justifica a não aplicação destas no S.R.A.

O teste de vermelho de metila (V. M.) verifica a habilidade dos microrganismos em produzir e manter estáveis produtos finais ácidos a partir da fermentação da glicose, superando a capacidade de tamponamento do sistema, enquanto o teste de indol permite determinar a habilidade de um microrganismo em formar indol a partir do aminoácido triptofano. Esses testes são importantes na caracterização e diferenciação de bactérias por chaves de identificação. As cepas apresentaram respostas variadas aos testes de V.M. e indol, sendo 15 cepas com reação positiva para o primeiro teste e 7 para o segundo, o que indica uma grande variabilidade nas cepas isoladas.

As cepas C9, C14, C15, C16, R3 e R5 apresentaram resultados negativos quanto ao teste de Rodamina B, ou seja, não apresentaram lipases extracelulares acima da capacidade de detecção do teste. Portanto, foram excluídas da avaliação da atividade lipolítica. Enquanto que a reação das cepas com resultados positivos foram utilizados para os próximos experimentos (Figura 16). O teste de rodamina B detecta a presença de lipase extracelular de microrganismo lipolítico com sensibilidade mínima de atividade lipolítica de 0,002 U/mg por proteína (JETTE e ZIOMEK, 1994). A elevada sensibilidade do teste detecta atividade lipolítica mesmo em microrganismos que apresentam baixa produção de lipase extracelular

---

(MACKENZIE et al., 1967; KOUKER e JAEGER, 1987; JARVIS e THIELE, 1997, BREISSON et al., 2000).

Segundo Haba et al. (2000), a variação do tempo de incubação do teste é decorrente do tempo de crescimento de cada espécie de bactéria. Esses pesquisadores avaliaram a atividade lipolítica em vários gêneros de bactérias (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Candida*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* e *Serratia*) e o teste de rodamina B variou entre 24 e 72 horas a 30°C. O halo laranja-fluorescente formado ao redor das colônias das cepas lipolíticas isoladas nesta pesquisa foi observado, sob a luz U.V., após 24 a 48 horas.

Utilizando como fonte de bactérias o efluente de esgoto sanitário, Haba et al. (2000), conseguiram isolar 47 cepas de bactérias, sendo que 40 cepas apresentaram atividade lipolítica e foram selecionadas também pelo teste da rodamina B. Jarvis e Theile (1997) isolaram bactérias do esgoto sanitário proveniente de um reator anaeróbio, em escala piloto, selecionando 5 cepas de bactérias lipolíticas do gênero *Clostridium* também através do teste de rodamina B.

Segundo Lock (2007), a cepa da levedura *Debaryomyces melissophylus* (BI81) que apresentou um halo maior e mais acentuado no teste de rodamina - B que as demais amostras, também foi a melhor produtora de lipase.

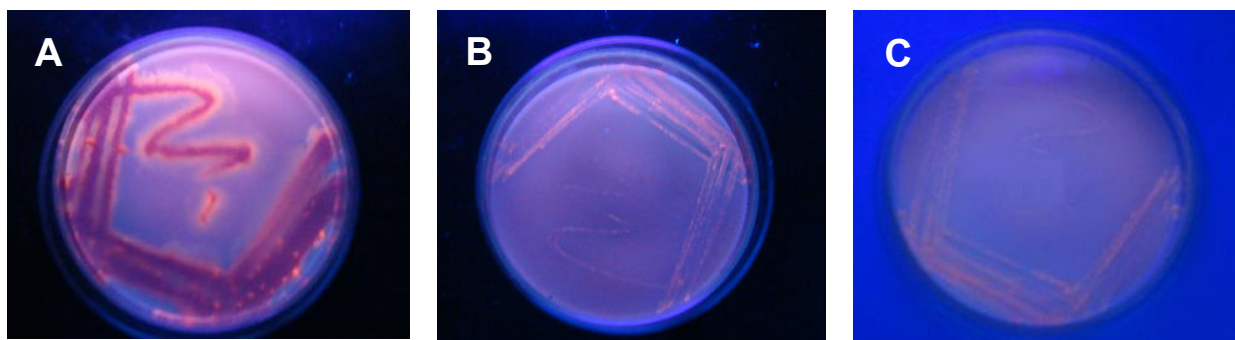


Figura 16 – Reação apresentada pelas cepas lipolíticas ao teste de Rodamina B utilizando luz U.V. (350nm). (A) Cepa C1, (B) Cepa R1 e (C) Cepa J.

As cepas que apresentaram maior atividade lipolítica por espectrofotometria demonstraram maior crescimento nas placas com Rodamina-B, que é um indicador da presença de ácidos graxos. Ou seja, cepas com atividade lipolítica elevada degradam uma concentração maior de óleo de soja presente nas placas de petri,

isto é revelado pela maior fluorescência das placas quando submetidas à luz U.V. (365 nm). Dessa forma, a rodamina-B se demonstrou um bom pré-seletor.

A sensibilidade, a rapidez e a simplicidade do teste de rodamina B para a triagem de bactérias lipolíticas foram as principais razões para a utilização desse teste no presente trabalho.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE CEPAS BACTERIANAS POR ESPECTROFOTOMETRIA.

A atividade lipolítica por proteína das 19 cepas de bactérias lipolíticas selecionadas através do teste de rodamina B é mostrada na Figura 17.

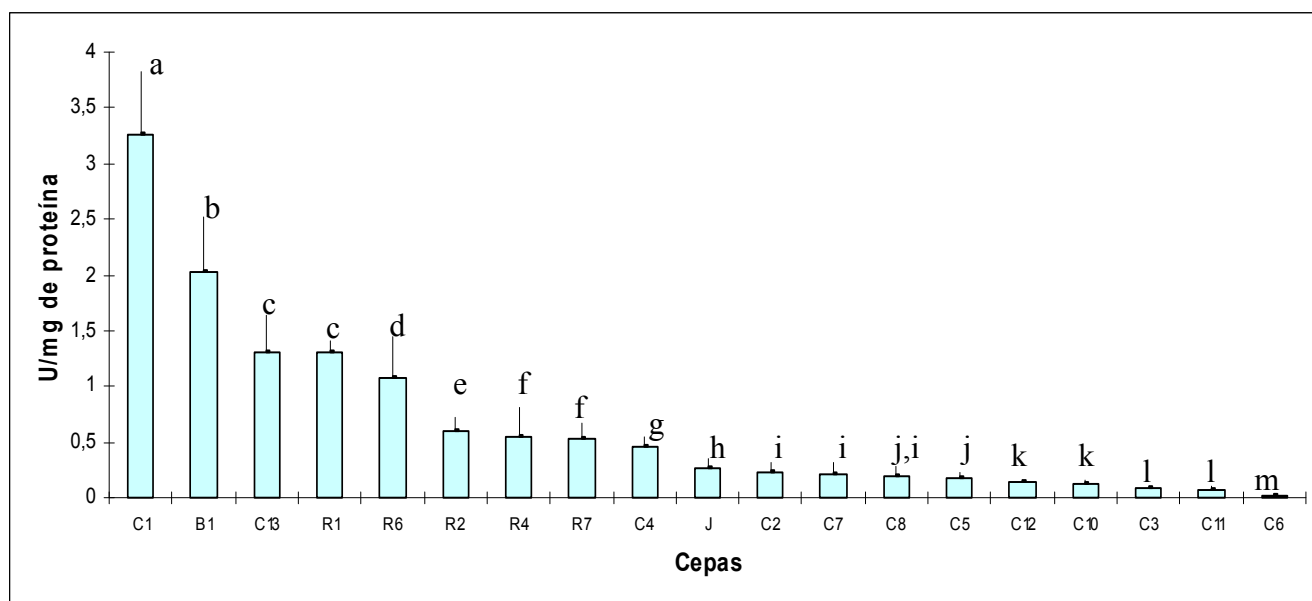


Figura 17 – Atividade lipolítica em U( $\mu$ mol/min) por mg de proteína das cepas selecionadas após 120 horas de enriquecimento e grupos definidos pelo teste F. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

Os resultados observados, utilizando meio mínimo adicionado óleo de soja, evidenciaram uma resposta diversificada variando de 0,02 U/mg (C6) a 3,25 U/mg (C1) de proteína. Além das cepas C1 e B1, as cepas C13, R1 e R7 também se destacaram em relação à atividade lipolítica das demais cepas. Analisando-se as cepas com menores atividades lipolíticas, percebe-se que as cepas isoladas de amostra de espuma de caixa de gordura do R.U.-UFES tiveram uma atividade maior



do que as cepas isoladas de amostra de espuma de caixa de gordura residencial. A cepa J obteve uma atividade lipolítica intermediária entre esses dois grupos.

O resultado do teste F (ANOVA), feito com o objetivo de comparar os valores de atividade lipolítica entre as 19 cepas, indicou diferença significativa entre as cepas, gerando assim 13 grupos (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l e m). Isto representa que a atividade lipolítica das cepas estudadas foi estatisticamente diferente ao nível de 95% de confiança, sendo que, algumas cepas se encontram em mais de um grupo. Entretanto, dentro de cada grupo, as cepas apresentaram atividades lipolíticas significativamente iguais ( $p > 0,05$  em cada grupo).

As atividades lipolíticas encontradas nesse trabalho estão de acordo com as atividades encontradas na literatura para cepas de microrganismos cultivadas em condições semelhantes.

Semionato (2006) obteve valores de atividade lipolítica para cepas bacterianas isoladas de dispositivos de remoção de gordura entre 0,076 e 3,20 U/mg de proteínas após 120h de cultivo a 28°C e pH 8. Esses resultados estão de acordo com os encontrados nessa pesquisa.

Maia *et al.* (2001) avaliou a atividade lipolítica do fungo *Fusarium solani* também cultivado a 28°C e 120 rpm testando diferentes tipos de óleo como fonte de carbono e usando os métodos de Winkler e Stuckmann (1979) e Bradford (1976). Os resultados encontrados variaram entre 0,06 e 0,45 U/mg, sendo a maior atividade lipolítica determinada com o óleo de sésamo como fonte de carbono e pH 7,8.

Corzo e Revah (1999) analisaram a influência dos parâmetros temperatura, pH e tempo de incubação na atividade específica da levedura *Yarrowia lipolytica* pelo método de titulação de ácidos graxos liberados. Nas condições de pH 6 e temperatura 30°C, mais próximas das condições deste trabalho, foram encontradas atividades específicas de  $2,0 \pm 0,1$  U/mg tanto a 48 como a 60h de incubação. Nas mesmas condições, porém à temperatura de 34°C, a atividade lipolítica reduziu para  $1,4 \pm 0,0$  U/mg a 48h e  $0,8 \pm 0,0$  U/mg a 60h de incubação. Um maior tempo de incubação proporcionou um aumento na biomassa, mas não necessariamente na produção de lipase.

Gioielli, Oliveira e Oliveira (1999) avaliaram a atividade lipolítica da enzima comercial Lipase FAP (Amano) obtida de uma cultura única do fungo *Rhizopus*. A atividade específica foi avaliada para a reação de hidrólise de gordura de babaçu a 40°C e variou entre 0,566 U/mg para concentração enzimática de 279,6 U/mL e 26,6h de

reação e 22,740 U/mg em concentração de 165U/mL e 1h de reação. PLOU *et al.* (1998) avaliou a atividade lipolítica de enzimas comerciais em condições ótimas de pH variando entre 7 e 8 a temperatura de 25°C. Usando a trioleína como substrato, obteve atividades de 7,6 U/mg para lipase de *Candida rugosa*, 0,6 U/mg para lipase de *Rhizopus sp.*, 0,3 U/mg para lipase de *Humicola*, 0,6 U/mg para lipase pancreática, e 7,0 U/mg para Lipozyme de *Mucor miehei*. As enzimas puras comerciais apresentam uma atividade normalmente mais alta que as lipases avaliadas em cepas de microorganismos.

Rahman *et al.* (2007) isolaram 29 cepas bacterianas potencialmente lipolíticas de efluente de indústria de óleo de palma. A maior atividade lipolítica encontrada foi de 0,15 U/ml após 24 h de incubação a 70°C para a cepa identificada como *Geobacillus zalihae*.

Dharmsthiti e Kuhasuntisuk (1998) isolaram cepas de *Pseudomonas aeruginosa* LP602 de amostras de esgoto doméstico e avaliaram a atividade lipolítica pelo método colorimétrico do p-nitrofenil palmitato sob condições de pH 8 e 37°C. A atividade lipolítica variou entre 0,1 e 3,5 U/mL, sendo os melhores resultados encontrados com o óleo de soja como fonte de carbono.

Li, Zhong e Wu (2009) realizaram transesterificação enzimática usando a enzima lipase pura de *Penicillium expansus* imobilizada como catalisadora e o óleo de fritura usado e o óleo de milho refinado como substratos obtendo rendimentos de 92,8 e 85% na produção de biodiesel, respectivamente. A enzima utilizada apresentava atividade lipolítica detectada em reação de hidrólise de 6,7 U/mg e foi imobilizada em resina D4020 de forma não dispendiosa. Após a imobilização, foram detectadas atividades de transesterificação de 0,4 U/mg (quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de oleato de metila da reação de metanol e trioleína em 1 min a 35 °C) e de esterificação de 0,112 U/mg (quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de oleato de metila da reação de metanol e ácido oléico em 1 min a 35 °C).

As atividades lipolíticas encontradas nesta pesquisa para as cepas bacterianas C1 e B1 se aproximam da atividade lipolítica inicial da enzima pura de *Penicillium expansus*, o que sugere que essas cepas têm potencial para aplicação na reação de transesterificação enzimática. Além disso, a imobilização da lipase muitas vezes promove uma alteração nas propriedades da enzima que provoca o aumento da sua atividade e especificidade (SEBRÃO *et al.*, 2007; PALOMO *et al.*, 2006).

---

A cepa SOD-1 de *Acinetobacter sp.* referenciada por Sugimori, Nakamura e Mihara (2002), obteve atividade lipolítica de 1,34 U/L utilizando quite S para lipase (Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japão), valor distinto do encontrado nesta pesquisa, o que mostra a importância da metodologia empregada para medir a atividade lipolítica. A cepa estudada por estes autores apresentou as maiores taxas de degradação de lipídios num pH=8 e temperatura de aproximadamente 37 °C.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE CEPAS BACTERIANAS E DE UMA LIPASE COMERCIAL, ATRAVÉS DO MONITORAMENTO PARALELO DO TEOR DE ÓLEOS E GRAXAS E DA BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DE DIFERENTES RESÍDUOS OLEOSOS ORIUNDOS DO SANEAMENTO AMBIENTAL.

As cepas bacterianas foram testadas e comparadas a uma lipase comercial, através do monitoramento paralelo do teor de óleos e graxas e da biodegradação aeróbia de diferentes resíduos oleosos e ou gordurosos coletados de caixas de gordura do Restaurante Universitário – UFES e da ETE – UFES e lodo UASB (ETE – UFES) acrescido de óleo de soja comercial e óleo de fritura doméstico. Estes resíduos foram previamente avaliados físico-quimicamente.

##### 5.4.1 Avaliação do processo de biodegradação aeróbia por respirometria.

Após a escolha das cepas bacterianas, que foi baseada na atividade lipolítica apresentada, instalou-se o sistema de respirometria aeróbia obtendo-se as curvas de biodegradação de cada combinação de bactérias isoladas com os resíduos oleosos conforme visualizado nas Figuras 18, 19, 20 e 21.

O estudo do comportamento dos 4 resíduos oleosos inoculados com as cepas C1, B1, R1 e J liofilizadas e lipase comercial foi realizado por um período de 30 dias, indicando que as isoladas apresentaram uma fase de aclimação nos primeiros dias do experimento (fase lag), sobretudo no óleo de fritura que durou aproximadamente quatro dias. Isto ocorreu porque as células foram transferidas de um meio para outro e esta fase de ajuste representou o período necessário para adaptação das células ao novo ambiente (ALEXANDER, 1999). A final do experimento, próximo dos 30 dias

---

de ensaio respirométrico, pode-se perceber uma estabilização na curva de produção de CO<sub>2</sub>.

De acordo com os gráficos das Figuras 18, 19, 20 e 21 a produção de CO<sub>2</sub> como indicador do processo de biodegradabilidade, as cepas mostraram diferentes potenciais de biodegradação no sistema substrato/resíduo oleoso dos respirômetros, verificando-se que a adição do resíduo no sistema proporcionou aumento na produção de CO<sub>2</sub>. Segundo Moraes (2005), a adição de inóculo e fertilizante proporcionam acréscimo de 1,8% e 5,3% respectivamente, na produção de CO<sub>2</sub>, comparado com o controle solo/resíduo no tratamento do resíduo oleoso de refinaria através do sistema de biopilhas.

Os diferentes potenciais de degradação estão relacionados à atividade lipolítica das cepas por espectrofotometria. As maiores produções de CO<sub>2</sub> foram observadas para a lipase comercial, seguida pelas cepas C1 e B1, variando de 313,64 a 1563,89 mg de CO<sub>2</sub>. Essas taxas representam o resíduo da caixa de gordura do R.U. sem inóculo (controle residual, sem adição de bactérias exógenas) e o tratamento do resíduo da ETE-UFES com lipase comercial, respectivamente.

De acordo com Teles (2006), os ensaios de biodegradabilidade de lodo de esgoto, apresentaram uma variação na produção de CO<sub>2</sub> de 170 a 1570 mg de CO<sub>2</sub>, em 32 dias de incubação, em função das dosagens utilizadas. Essas variações na produção de CO<sub>2</sub> ocorrem primeiramente devido às características físico-químicas dos resíduos. Neste trabalho a produção de CO<sub>2</sub> variou muito em função da DQO do resíduo analisado, entretanto na avaliação das aplicações de inóculos em um mesmo resíduo, pode-se perceber que as cepas que apresentaram maior atividade lipolítica obtiveram maiores produções de CO<sub>2</sub>. Isto ocorreu porque as cepas que possuem maior atividade enzimática produzem uma quantidade maior de lipases, que são responsáveis pela degradação inicial dos triglicerídeos presentes nos resíduos oleosos, ocorrendo pouca produção de CO<sub>2</sub>. A degradação inicial do resíduo contribui de sobremaneira para a decomposição deste pelos demais microrganismos saprófitos, fase em que ocorre maior produção de CO<sub>2</sub>.

---

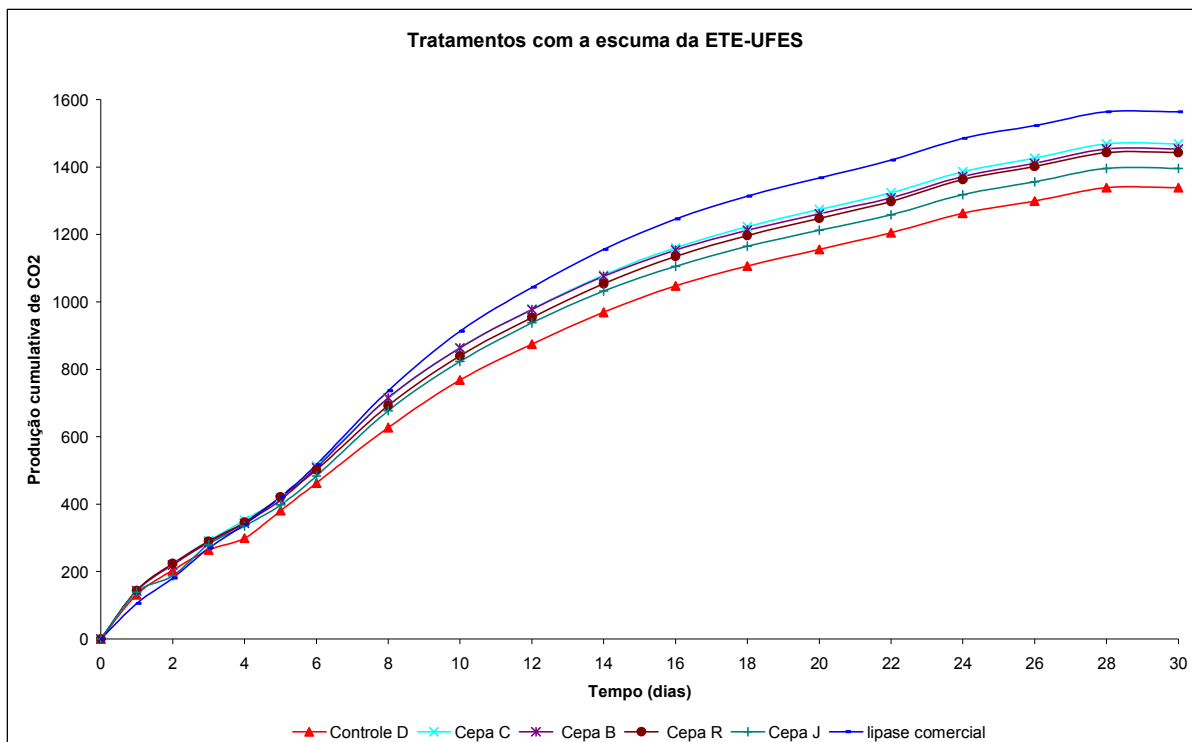


Figura 18 – Comparação da produção cumulativa de CO<sub>2</sub> (mg.100<sup>-1</sup> g de substrato ) utilizando o resíduo de caixa de gordura da ETE-UFES inoculado com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle (sem inóculo).

As menores produções de CO<sub>2</sub> nos tratamentos com a espuma do dispositivo de remoção de gordura da ETE-UFES ocorreram no controle, ou seja, tratamento sem inóculo (1340,02 mg CO<sub>2</sub>). A análise estatística (ANOVA) dos dados originados na degradação do resíduo da ETE-UFES pelos diversos tratamentos gerou diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), aos 30 dias de experimento, formando 5 grupos distintos: “a”, “b”, “c”, “d” e “e”, conforme pode ser verificado na Tabela 9 a seguir.

Tabela 9 – Tabela com os valores de CO<sub>2</sub> produzido e letras para indicar a diferença estatística significativa.

Inóculo Resíduo	Lipase	C1	B1	R1	J	Controle	DQO <sub>t</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	DQO/DBO
Óleo de fritura	1201,80 <sup>a</sup>	673,35 <sup>b</sup>	523,50 <sup>c</sup>	426,91 <sup>d</sup>	367,47 <sup>e</sup>	329,18 <sup>f</sup>	180000	2,25
Lodo UASB (5% de O. de soja v/v)	982,79 <sup>a</sup>	854,06 <sup>b</sup>	697,58 <sup>c</sup>	645,93 <sup>d</sup>	623,50 <sup>d</sup>	491,67 <sup>e</sup>	92000	2
Escuma R.U.	565,30 <sup>a</sup>	447,11 <sup>c</sup>	432,82 <sup>c</sup>	467,85 <sup>b</sup>	406,64 <sup>d</sup>	313,64 <sup>e</sup>	12500	2,05
Escuma ETE	1563,89 <sup>a</sup>	1469,38 <sup>b</sup>	1454,09 <sup>b,c</sup>	1442,95 <sup>c</sup>	1396,65 <sup>d</sup>	1340,02 <sup>e</sup>	<b>205000</b>	2,16

As elevadas taxas de degradação na espuma da ETE-UFES se devem a presença de uma grande microbiota intrínseca do resíduo e a alta carga de matéria orgânica medida indiretamente pela DQO do resíduo (aproximadamente 205000 mg de O<sub>2</sub>/L). A relação DBO/DQO da espuma de ETE-UFES, que mede a fração biodegradável do resíduo, foi 2,16, e indicou a grande biodegradabilidade do resíduo. No entanto, os dados se mostraram relativamente mais homogêneos, pois as diferenças de produção de CO<sub>2</sub> entre os tratamentos foram menores se comparados aos outros resíduos. Isto ocorreu porque o resíduo da ETE-UFES apresentou a maior microbiota fúngica e bacteriana no início ( $1183 \times 10^5$  UFC/g de substrato seco) e no final ( $2171 \times 10^5$  UFC/g de substrato seco) do experimento, ou seja, a grande população microbiana teve influência na produção de CO<sub>2</sub> e permitiu pouca diferença entre os tratamentos realizados com as cepas lipolíticas.

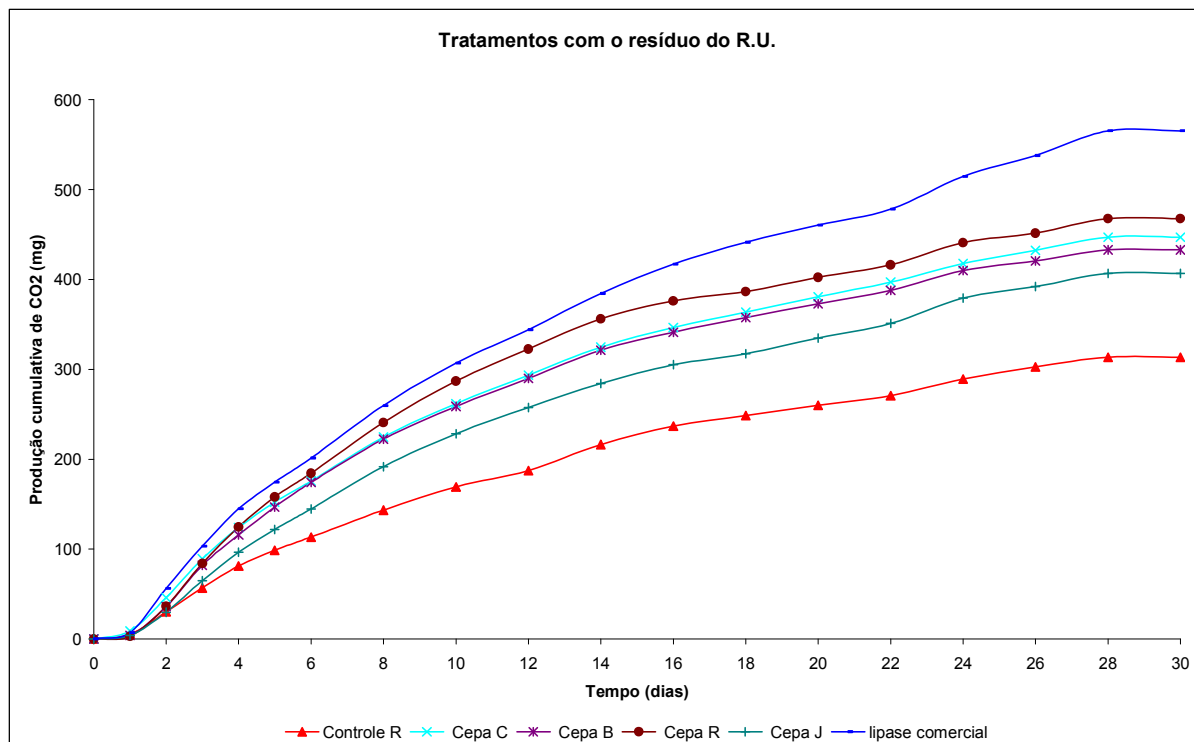


Figura 19 – Comparação da produção cumulativa de CO<sub>2</sub> (mg.100<sup>-1</sup> g de substrato ) utilizando o resíduo de caixa de gordura do R.U.-UFES inoculado com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle (sem inóculo).

Os tratamentos com o resíduo proveniente do dispositivo de remoção de gordura do RU-UFES apresentaram as taxas de degradação mais baixas variando entre 313,64 e 565,30 mg CO<sub>2</sub> (Figura 19). Estas taxas de degradação ocorreram no controle (sem inóculo) e no tratamento com a lipase comercial. As baixas taxas de degradação podem ser associadas a baixa carga de matéria orgânica apresentadas por esse resíduo, se comparada aos demais resíduos oleosos. A DQO e a DBO do resíduo da caixa de gordura do RU-UFES foram 12500 e 6100 mg de O<sub>2</sub>/L, respectivamente e essas foram as menores concentrações encontradas nos resíduos oleosos analisados neste experimento. No entanto, a relação DBO/DQO da espuma do RU-UFES foi 2,05, indicando a possibilidade de biodegradação do resíduo, mas o fator concentração de matéria orgânica medido pela DQO teve maior influência nos resultados e não possibilitou grande produção de CO<sub>2</sub> nos tratamentos realizados na espuma do RU-UFES.

A análise estatística (ANOVA) dos dados originados neste experimento de degradação do resíduo da caixa de gordura do RU-UFES pelos diversos tratamentos gerou diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), aos 30 dias de

experimento, e os grupos gerados pelo teste de Tukey são apresentados na Tabela 9.

Pode-se creditar o bom desempenho da cepa R1 nesse resíduo a especificidade cepa – substrato, pois esta cepa bacteriana foi isolada do mesmo resíduo (RU-UFES) no qual apresentou elevada produção de CO<sub>2</sub>, se comparada aos tratamentos com outras cepas bacterianas.

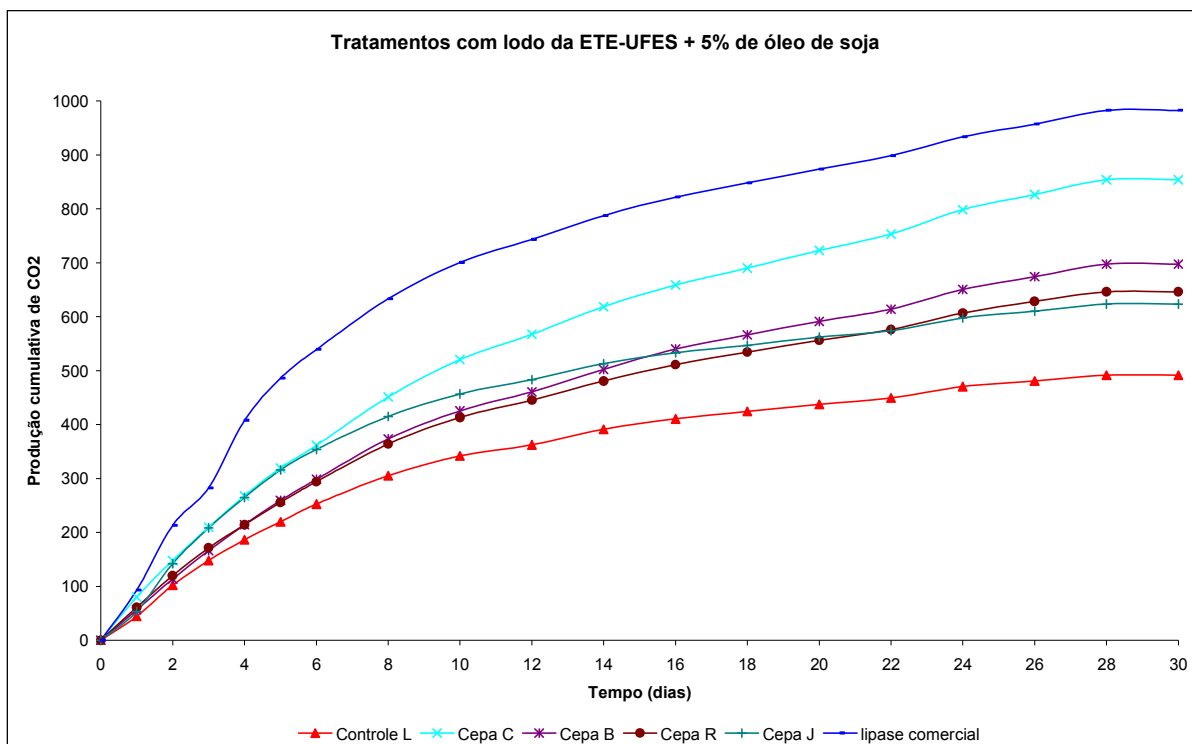


Figura 20 – Comparação da produção cumulativa de CO<sub>2</sub> (mg.100<sup>-1</sup> g de substrato ) utilizando lodo UASB da ETE/UFES com 5% de óleo de soja inoculado com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle (sem inóculo).

Ao lodo UASB ETE-UFES foi adicionado óleo de soja na concentração de 5% v/v, para elevar sua concentração de O&G a níveis similares dos demais resíduos oleosos e/ou gordurosos (Figura 20). Os tratamentos apresentaram taxas de degradação variando entre 491,67 e 982,79 mg CO<sub>2</sub>, para o controle (sem inóculo) e o tratamento com a lipase comercial, respectivamente. A produção de CO<sub>2</sub> no lodo UASB enriquecido com óleo de soja está também relacionada ao pH, próximo a 7, ideal para o crescimento de microrganismos lipolíticos e saprófitos, permitiu a elevada produção de CO<sub>2</sub>, captada pelos respirômetros.

A análise estatística (ANOVA) dos dados originados neste experimento de degradação do lodo UASB ETE-UFES, mostrou que os diversos tratamentos



geraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), aos 30 dias de experimento. Os grupos formados pelo teste de Tukey podem ser vistos na Tabela 9.

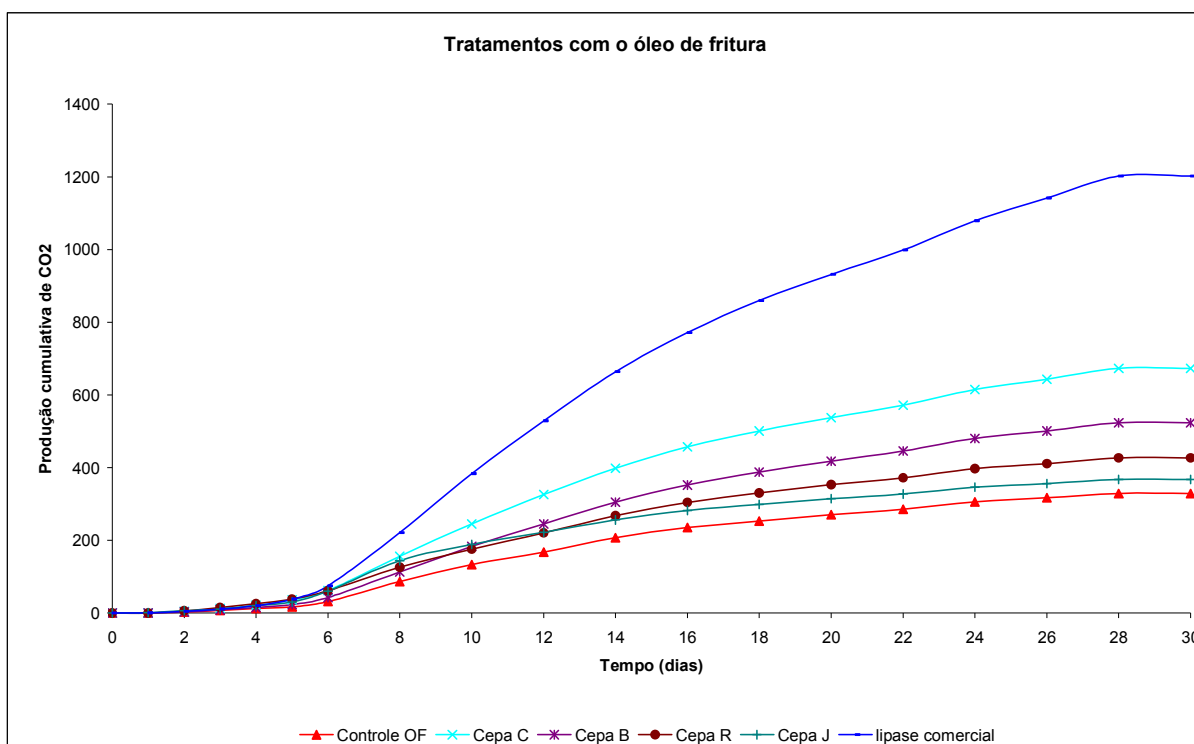


Figura 21 – Comparação da produção cumulativa de  $\text{CO}_2$  ( $\text{mg} \cdot 100^{-1} \text{ g de substrato}$ ) utilizando óleo de fritura inoculado com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle (sem inóculo).

Os tratamentos com o óleo de fritura, controle (sem inóculo) e com lipase comercial, apresentaram as taxas de degradação mais distintas variando entre 329,18 e 1271,79  $\text{mg CO}_2$ . O óleo de fritura apresentou o maior período de aclimação, aproximadamente 5 dias, neste período houve uma pequena taxa respirométrica. Esta é uma fase de adaptação dos microrganismos ao novo ambiente denominada fase lag (ALEXANDER, 1999), e a atividade marcante no resíduo é a lise dos triacilgliceróis pelas cepas lipolíticas inoculadas, uma vez que este resíduo apresentou pouca ou nenhuma microbiota inicial.

Com a análise estatística (ANOVA) dos dados originados neste experimento de degradação do resíduo da caixa de gordura do RU-UFES pelos diversos tratamentos geraram diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), aos 30 dias de experimento, formando 6 grupos distintos no teste de Tukey: “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f”. A lipase comercial apresentou a maior produção de  $\text{CO}_2$  (1201,79  $\text{mg de CO}_2$ ) e foi agrupada em “a”. Isto ocorreu porque uma grande concentração de lipase (5  $\text{mg/mL}$ )

foi utilizada neste tratamento, estas enzimas hidrolisam triacilgliceróis liberando ácidos graxos e glicerol que são compostos de mais fácil assimilação por microrganismos. Estes por sua vez, utilizam o substrato na alimentação, e na lise desses compostos para obtenção de energia necessária para desempenhar as funções vitais, liberam CO<sub>2</sub> no processo respiratório.

Este trabalho teve o objetivo de medir as produções de CO<sub>2</sub> de resíduos ricos em compostos de cadeia carbônicas longas e o sucesso de tecnologias aplicadas a biorremediação de hidrocarbonetos dependerá da capacidade de biodegradação das populações microbianas utilizadas como inoculantes, as quais podem ser nativas ou exógenas (RAMÍREZ et al., 2008).

Trabalhos recentes de respirometria aplicada à degradação de matéria orgânica do solo e da torta de filtro demonstraram uma produção total de CO<sub>2</sub> acumulado superior a 1216 mg de CO<sub>2</sub>, em 72 dias de ensaio, nos experimentos com uso de 28 mg/ kg de cádmio e com uma relação C/N de 11,1 na torta de filtro empregada (FIRME, 2005). Segundo Pedroti (2007) a produção de CO<sub>2</sub> dos tratamentos realizados por 29 dias com óleo bruto 1 na proporção de 5 % v/v, utilizando o substrato areia-vermiculita pode chegar a 250 mg de CO<sub>2</sub>. Estes resultados mostram que a produção de CO<sub>2</sub> está relacionada ao tempo de experimento, já que o estudo de Firme (2005) ocorreu em 72 dias, ou seja, mais que o dobro da duração desta pesquisa e obteve produção de CO<sub>2</sub> similar a alguns tratamentos realizados neste estudo. O tempo de experimento das pesquisas referidas (FIRME, 2005 e esta pesquisa) foi distinto, mas a produção de CO<sub>2</sub> foi similar porque, o tipo e as características físico-químicas do substrato analisado nos ensaios de respirometria eram diferentes. Os trabalhos de Firme (2005) e Pedroti (2007) utilizaram como substrato, torta de filtro (com uma relação C/N de 11,1) e óleo bruto (com 0,9039 g/cm<sup>3</sup> de densidade relativa e °API igual a 40), respectivamente, porém este estudo foi realizado com espuma da caixa de gordura da ETE-UFES como substrato, que apresentou uma DQO de aproximadamente 205000 e relação C/N de 6,46, representando um resíduo com características completamente distintas daquelas apresentadas pelos substratos das demais pesquisas citadas.

O gráfico de erro da produção de CO<sub>2</sub> (mg.100g<sup>-1</sup> de substrato) acumulada aos 30 dias, com intervalo de confiança de 95%, para os tratamentos realizados nos resíduos oleosos do saneamento inoculados com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle é mostrado na Figura 22.

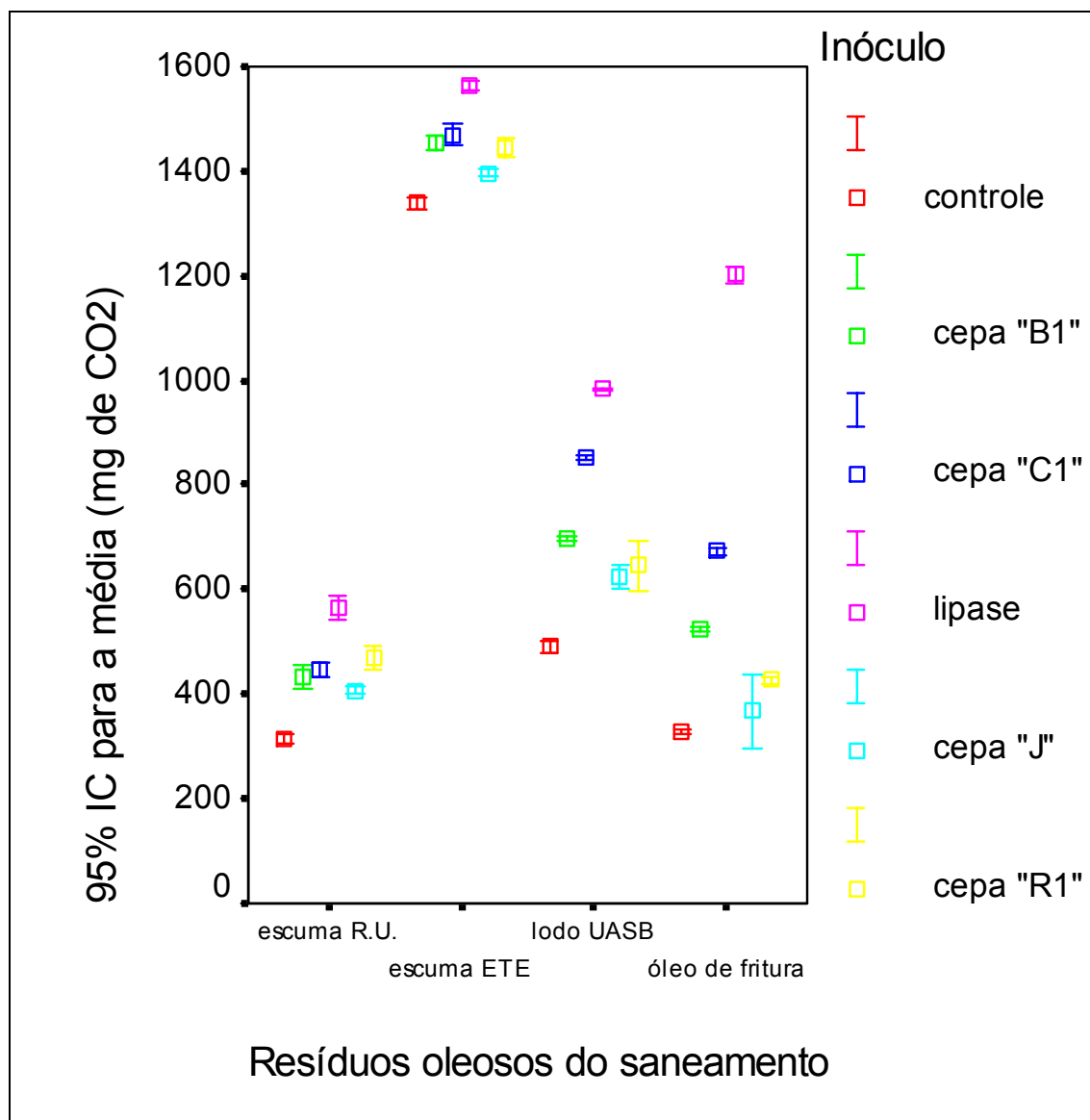


Figura 22 – Gráfico de erro da produção de CO<sub>2</sub> (mg.100g<sup>-1</sup> de substrato) acumulada aos 30 dias, com intervalo de confiança de 95%, para os tratamentos realizados nos resíduos oleosos inoculados com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle.

A Figura 22 apresenta a comparação da produção de CO<sub>2</sub> (mg.100g<sup>-1</sup> de substrato) acumulada aos 30 dias, nos tratamentos realizados com os resíduos oleosos do saneamento, e permite verificar a diferença estatística ao nível de 95% de confiança.

#### 5.4.2 Avaliação do teor de óleos e graxas, durante o processo de biodegradação aeróbia por respirometria.

A avaliação do teor de O&G foi realizada pelo método de Soxhlet paralelamente ao sistema de respirometria aeróbia, no experimento com 4 resíduos oleosos provenientes dos dispositivos de retenção de sólidos gordurosos do RU-UFES e ETE-UFES, lodo do reator UASB da ETE-UFES acrescido de óleo de soja comercial e óleo de fritura. Estes experimentos foram realizados de forma paralela com o objetivo de verificar se havia diminuição no teor de óleos e graxas dos resíduos inoculados com bactérias lipolíticas, e se esta redução estaria relacionada com a produção de CO<sub>2</sub> do sistema de respirometria aeróbia. Foram utilizados 4 tratamentos com cepas lipolíticas (C1, B1, R1 e J), uma lipase comercial AK Amano 20 (Amano Co., Japão) e o controle (sem inóculo). Os resultados da remoção de O&G nas condições de cada tratamento, no período de 30 dias do experimento. As medidas foram realizadas aos 0, 10, 20 e 30 dias de experimento.

Neste experimento observou-se uma tendência de decaimento da concentração de O&G em todas as condições de tratamento (Figuras 23, 24, 25 e 26), uma vez que estes foram realizados com cepas bacterianas lipolíticas, responsáveis pela degradação dos O&G em compostos químicos menores como glicerol e ácidos graxos, e estes compostos são assimilados pelas cepas lipolíticas e por microrganismos saprófitos, diminuindo o teor de O&G. Os resultados obtidos indicaram que, durante o período avaliado, as cepas mostraram diferentes potenciais de biodegradação, avaliadas em termos de remoção de O&G, e isto ocorreu porque as cepas utilizadas possuem atividade lipolítica distinta. Os diferentes potenciais de remoção de O&G foram compatíveis com o sistema de respirometria aeróbia, pois a diminuição no teor de O&G foi acompanhada pelo aumento na produção de CO<sub>2</sub> dos tratamentos, comprovando a hipótese de que ambos pudessem estar relacionados.

A ANOVA fatorial do teor de O&G aos 30 dias deste experimento revelou que houve diferença significativa entre os resíduos (fatores), inoculantes (níveis) e suas interações, pois  $p < 0,05$ , indicando diferença estatística entre os dados avaliados (Tabela 12). A ANOVA fatorial é realizada em experimentos fatoriais, nos quais são estudados os efeitos de dois ou mais tipos de tratamento, ao mesmo tempo. Estes ensaios foram realizados com 4 fatores, que são os resíduos oleosos: da espuma de ETE-UFES, do RU-UFES, lodo UASB ETE-UFES (5% v/v de óleo de soja) e óleo de

---

fritura. Os 4 fatores foram estudados em 6 níveis, neste caso tipos de inóculo: o controle (sem inóculo), a lipase comercial, as cepas C1, B1, R1 e J.

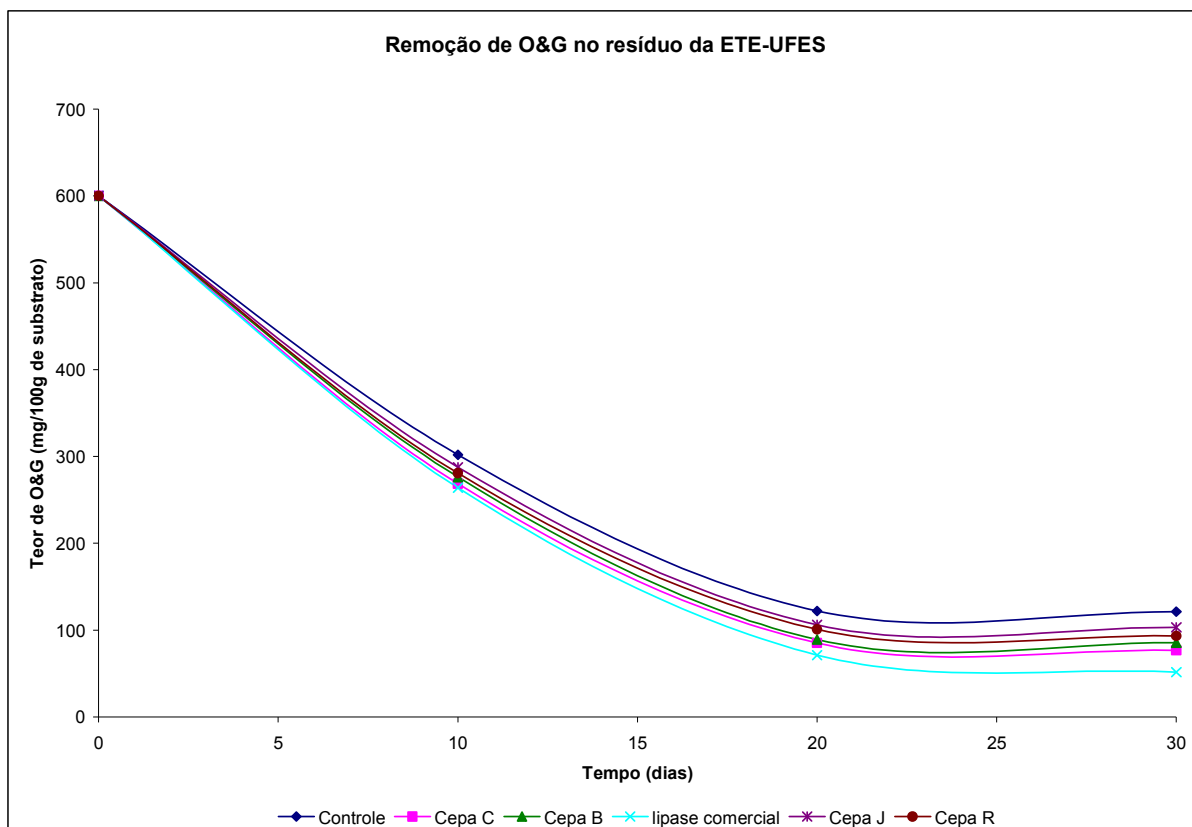


Figura 23 – Remoção de O&G ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de substrato) nos diversos tratamentos realizados com o resíduo oleoso proveniente de caixa de gordura da ETE-UFES.

Dentre as condições de tratamento dos testes com o resíduo da ETE-UFES (Figura 23), o decaimento mais acentuado foi o tratamento suplementado com lipase comercial, onde ocorreu uma remoção de  $548,33 \text{ mg O\&G } 100\text{g}^{-1}$  substrato. O tratamento sem acréscimo de bactérias (controle), apresentou uma remoção próxima a  $479 \text{ mg O\&G } 100\text{g}^{-1}$  de substrato, este decaimento se deve a ação degradadora de microrganismos intrínsecos ao resíduo analisado.

O teste de Tukey, que consiste na comparação das médias e das diferenças entre elas, foi realizado com os inoculantes aplicados no resíduo de caixa de gordura da ETE-UFES revelando que os tratamentos suplementados com as cepas B1 e C1, assim como R1 e J foram similares neste resíduo, e pouco diferiram estatisticamente ao nível de 95% de confiança.

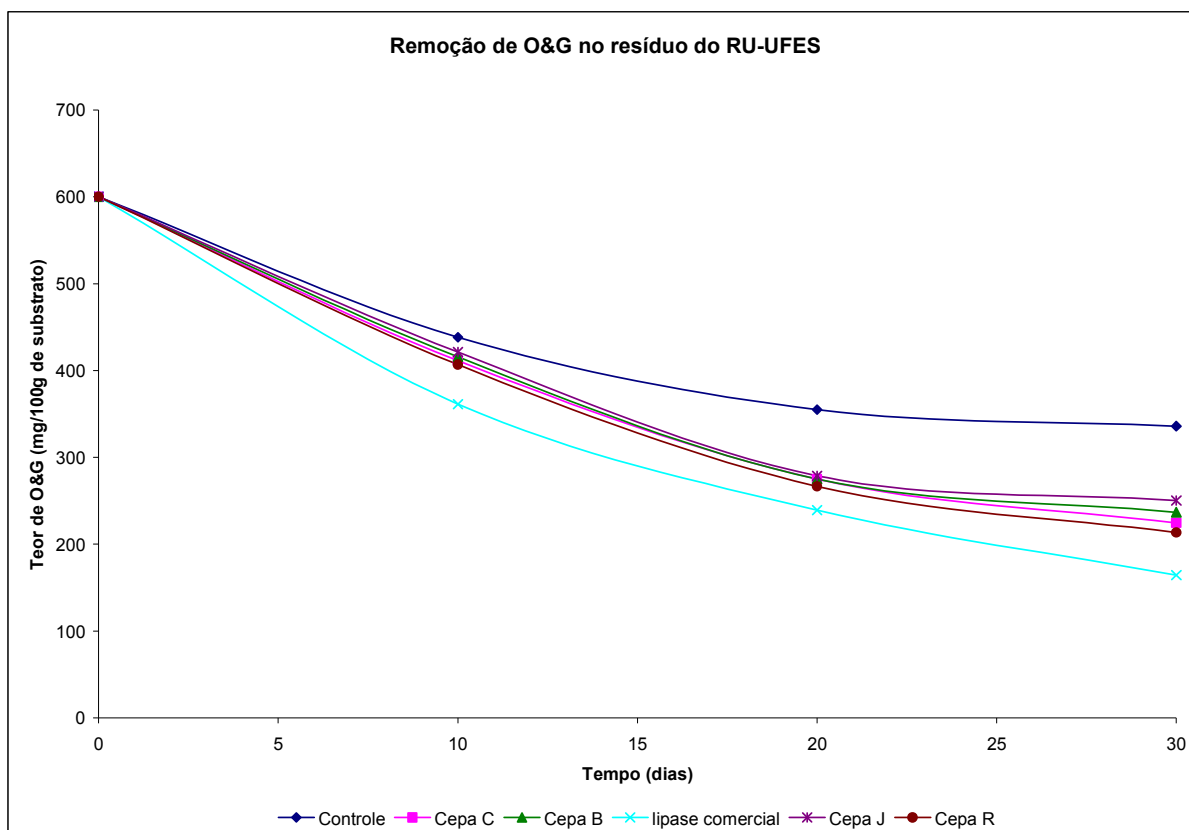


Figura 24 – Remoção de O&G ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de substrato) nos diversos tratamentos realizados com o resíduo oleoso proveniente de caixa de gordura do RU-UFES.

O gráfico de degradação de O&G do resíduo de caixa de gordura do RU-UFES (Figura 24) apresentou decaimento menos acentuado que os demais, isso pode ter ocorrido em função da baixa presença de microrganismos nesse resíduo no final do experimento ( $571 \times 10^5$  UFC/g de substrato seco) e em virtude da baixa produção de  $\text{CO}_2$  desse resíduo. A maior remoção ocorreu no tratamento com a lipase comercial, onde ocorreu um decaimento de  $435,66 \text{ mg O\&G } 100\text{g}^{-1}$  de substrato. Os tratamentos com as cepas B1, C1 e R1 foram similares no experimento com este resíduo, e pouco diferiram no teste de Tukey ao nível de 95% de confiança. No entanto, a cepa R1 apresentou a maior remoção dentre as cepas bacterianas testadas neste ensaio ( $386,66 \text{ mg O\&G } 100\text{g}^{-1}$  de substrato), demonstrando que ocorreu especificidade cepa-substrato, já que a cepa em questão foi isolada da caixa de gordura do RU-UFES. Da mesma forma, as cepas C1 e B1 isoladas de caixa de gordura doméstica, também apresentaram elevada remoção de O&G no resíduo da caixa de gordura da ETE-UFES, que possui origem doméstica.

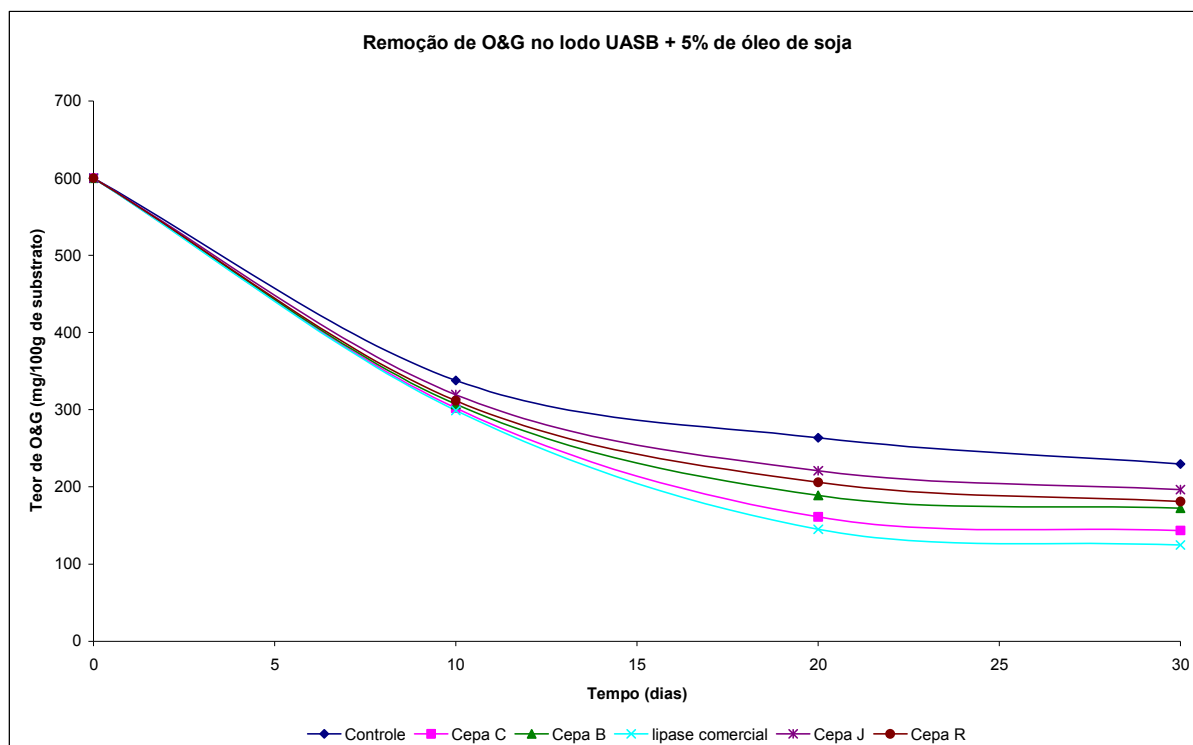


Figura 25 – Remoção de O&G ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de substrato) nos diversos tratamentos realizados com o lodo UASB da ETE-UFES.

Analisando o gráfico de remoção de O&G no lodo UASB ETE-UFES (Figura 25) adicionado de 5% de óleo de soja, observou-se o decaimento de concentração de O&G em todas as condições de tratamento. Sendo que, a maior remoção ocorreu no tratamento com a lipase comercial, onde ocorreu um decaimento de  $475,33 \text{ mg O\&G } 100\text{g}^{-1}$  de substrato e a menor remoção foi verificada no tratamento sem inóculo bacteriano (controle) com um decaimento de  $370,33 \text{ mg O\&G } 100\text{g}^{-1}$  de substrato. Somente os tratamentos com as cepas B1 e R1 não diferiram estatisticamente no teste de Tukey ao nível de 95% de confiança, visto que  $p > 0,05$ . Isto pode ter ocorrido em função da alta atividade enzimática da cepa R1 sobre o lodo UASB. Esta cepa foi isolada do resíduo de espuma do R.U., que possui altas concentrações de O&G ( $33,42 \text{ g/L}$ ), mas que são comparáveis aquelas apresentadas pelo lodo UASB ETE-UFES adicionado de óleo de soja (5%v/v) que apresentou  $38,81 \text{ g/L}$  de O&G. E, conseqüentemente um decréscimo na atividade lipolítica da cepa B1, visto que esta estirpe, isolada de caixa de gordura predial, apresentou ótimos resultados na atividade lipolítica por espectrofotometria, e pode não ter se adaptado tão bem ao

resíduo do lodo UASB ETE-UFES devido a produtos tóxicos ou recalcitrantes, que não afetaram as outras cepas isoladas de outros locais.

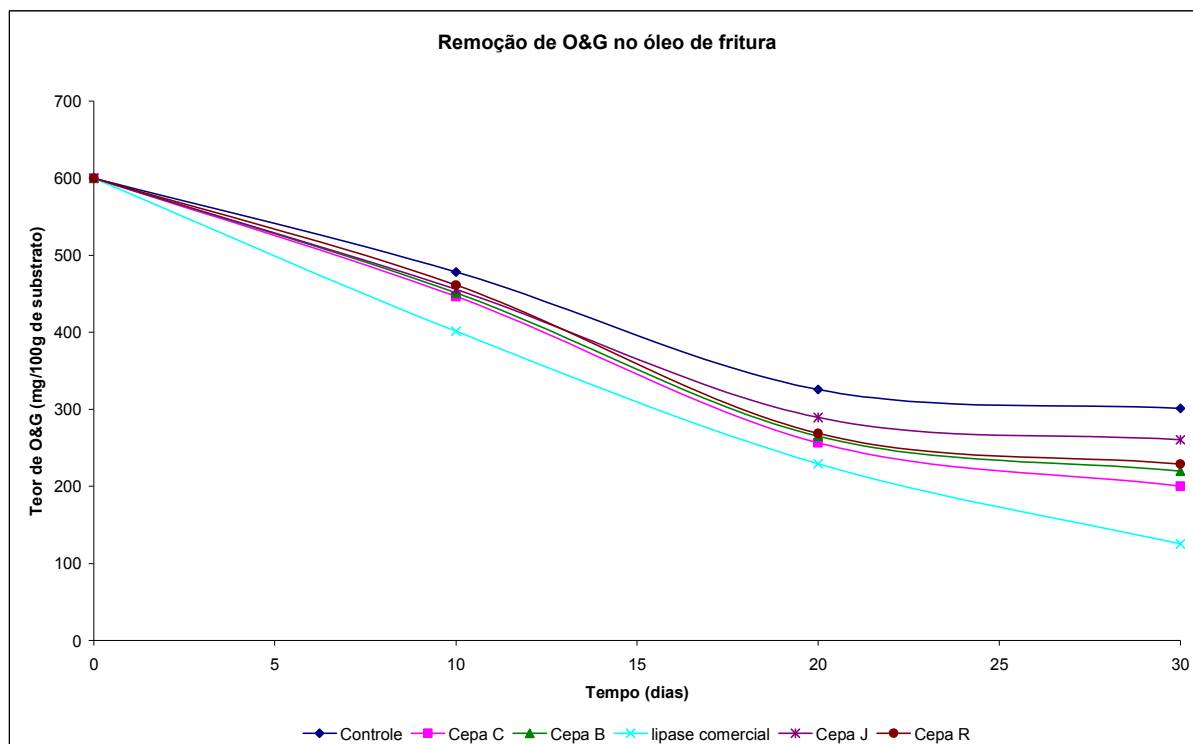


Figura 26 – Remoção de O&G ( $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de substrato) nos diversos tratamentos realizados com o óleo de fritura.

A partir do gráfico de remoção de O&G no óleo de fritura (Figura 26) observou-se o decaimento de concentração de O&G em todas as condições de tratamento. A maior remoção ocorreu no tratamento com a lipase comercial, onde ocorreu um decaimento de  $474,66 \text{ mg O\&G } 100\text{g}^{-1}$  substrato e a menor remoção foi verificada no tratamento sem inóculo bacteriano (controle) com um decaimento de  $299 \text{ mg O\&G } 100\text{g}^{-1}$  substrato. Os tratamentos com as cepas B1 e R1 não diferiram estatisticamente no teste de Tukey ao nível de 95% de confiança.

O gráfico de erro da remoção de O&G ( $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de substrato) com intervalo de confiança de 95% para os tratamentos realizados nos resíduos oleosos do saneamento inoculados com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle é mostrado na Figura 27.



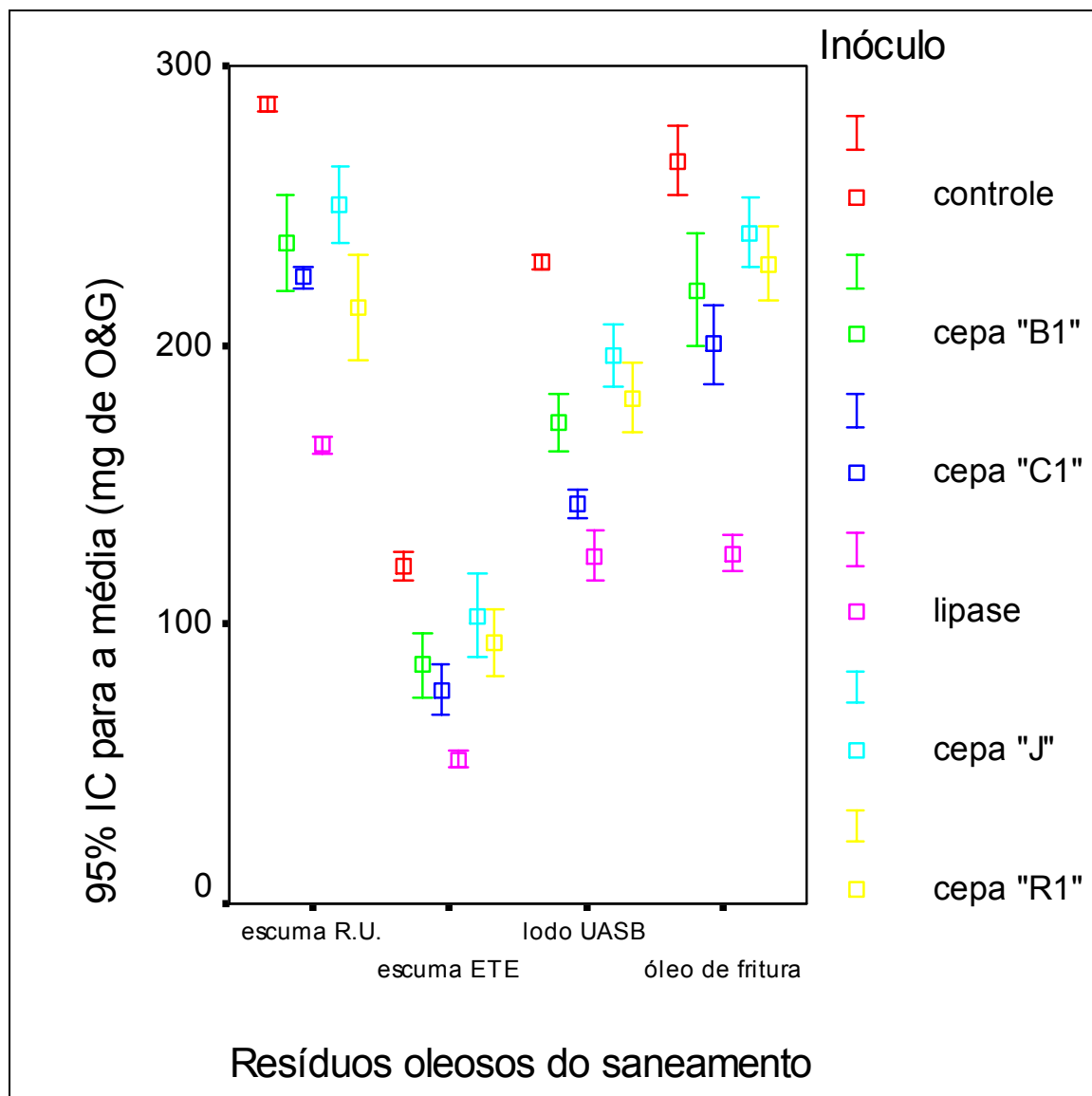


Figura 27 – Gráfico de erro da remoção de O&G ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de substrato) aos 30 dias, com intervalo de confiança de 95%, para os tratamentos realizados nos resíduos oleosos inoculados com diferentes cepas bacterianas (C1, B1, R1 e J) liofilizadas, lipase comercial e o controle.

A Figura 27 apresenta a comparação da remoção de O&G ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de substrato) aos 30 dias, nos tratamentos realizados com os resíduos oleosos do saneamento e, permite verificar a diferença estatística ao nível de 95% de confiança.

A remoção de O&G dos testes de decaimento é apresentada em termos percentuais na Figura 28.

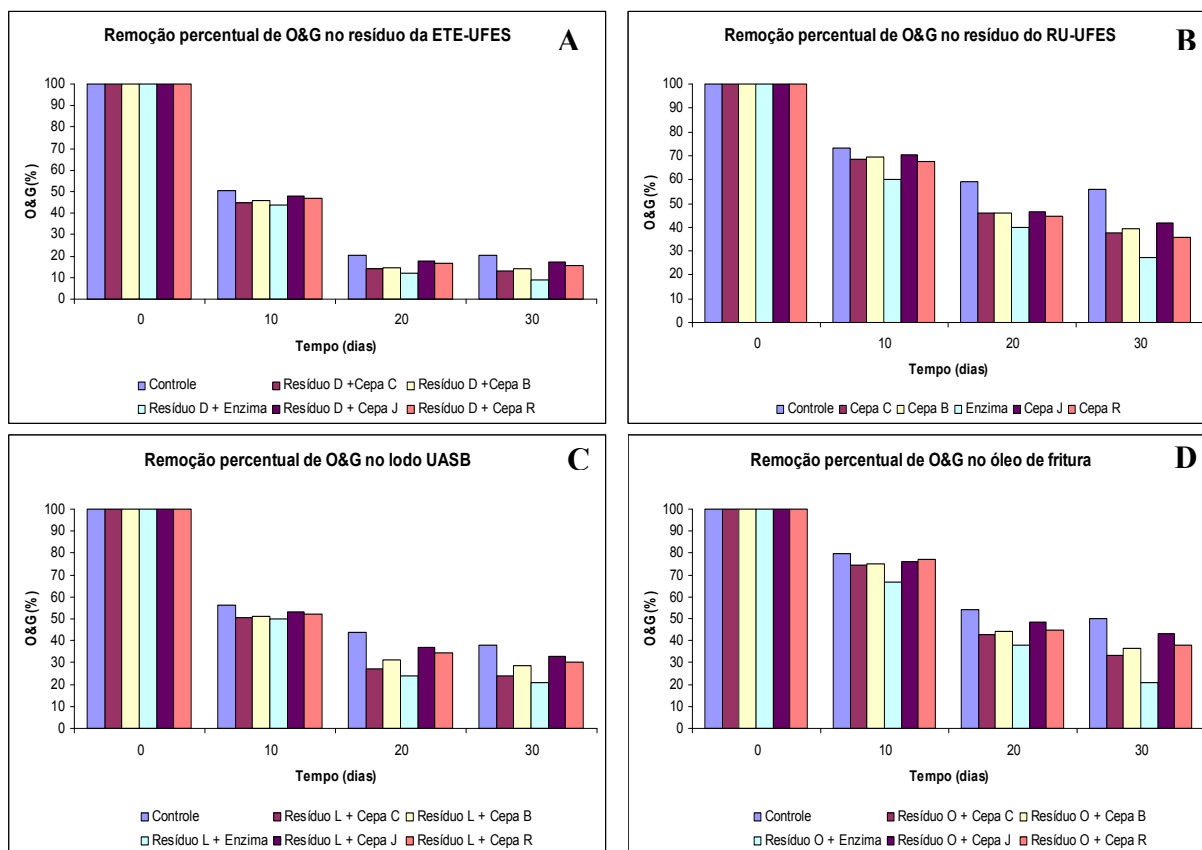


Figura 28 – Remoção percentual de O&G nos diversos tratamentos realizados com os resíduos oleosos e ou gordurosos. (A) resíduo da caixa de gordura ETE-UFES, (B) resíduo da caixa de gordura do R.U.-UFES, (C) lodo UASB ETE-UFES e (D) óleo de fritura.

A maior taxa de remoção ocorreu no resíduo da caixa de gordura da ETE-UFES suplementado com a lipase comercial com 91,39% de remoção (Figura 28 – A). As elevadas taxas de decaimento neste resíduo se devem a presença de uma microbiota de grande atividade no resíduo. Uma vez que, o resíduo da ETE-UFES apresentou a maior microbiota fúngica e bacteriana no início ( $1183 \times 10^5$  UFC/g de substrato seco) e no final ( $2171 \times 10^5$  UFC/g de substrato seco) do experimento, ou seja, a grande população microbiana teve influência na remoção de O&G e permitiu pouca diferença entre os tratamentos realizados com as cepas lipolíticas. Em contrapartida, a menor taxa de remoção de O&G ocorreu no controle do resíduo do RU-UFES com apenas 49,83% de remoção (Figura 28 – B), e isto deve ter ocorrido porque esse resíduo apresentou uma pequena população microbiana inicial, de  $221 \times 10^5$  UFC/g de substrato seco, e final, de  $571 \times 10^5$  UFC/g de substrato seco, comparando-se ao resíduo da ETE-UFES.

O estudo de Semionato 2006 demonstrou a capacidade de remoção de 39,76% da concentração de O&G utilizando lipase de *Pseudomonas sp.* (Sigma, EUA), em

experimentos realizados por 20 dias, pH em torno de 7,0 e temperatura de  $25,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2$ , utilizando apenas lodo UASB e óleo de soja (10%) como substrato.

A cepa C1 apresentou valor de atividade lipolítica de 15,20 U/mg por proteína acima da enzima Lipolase do estudo citado por PEREIRA (2004), que realizou experimentos com tratamentos enzimáticos em lodo anaeróbio rico em gordura, proveniente de abatedouro de frango, as lipases da marca Novozyme: Lipozyme e Lipolase também apresentaram degradação de O&G no decorrer de seu experimento. As enzimas utilizadas apresentaram atividade lipolítica de 210 e 3,52 U/mg, respectivamente, em pH igual a 7. O resultado de atividade lipolítica por espectrofotometria mostra a elevada produção de lipase extracelular da cepa C1, justificando o decaimento dos valores de O&G no decorrer do experimento, pois de acordo com Jaeger et al., 1994, as lipases que são atuantes no metabolismo de microrganismos, hidrolisam especificamente óleos e gorduras num mecanismo denominado lipólise (CURI et al, 2002), liberando ácidos graxos e glicerol que também são degradados posteriormente para obtenção de energia. Porém, o decaimento verificado para a cepa C1 foi menor do que no tratamento acrescido de lipase comercial, visto que esta enzima possui atividade lipolítica de 20 U/mg por proteína, superior a da cepa C1. Apesar do valor de atividade lipolítica da lipase utilizada nos tratamentos desta pesquisa encontrar-se próximo da faixa de atividade lipolítica das enzimas testadas no estudo de Pereira (2004), a redução da concentração de O&G com Lipolase (68%) foi menor do que o tratamento com lipase desta pesquisa que teve como máximo valor a remoção de 91,39%, ambos num período de 30 dias. Embora o tempo de tratamento das duas pesquisas coincidirem, a atividade enzimática (U/mg) e tipo de tratamento (aeróbio ou anaeróbio) é fundamental para o entendimento da remoção de óleos e graxas.

A escolha da lipase microbiana *Pseudomonas fluorescens* (Amano Co., Japão) utilizada nesta pesquisa foi baseado nos relatos de literatura, em que bactérias do gênero *Pseudomonas* são as melhores produtoras da lipase (JAEGER e EGGERT, 2002). Foi comprovada em laboratório a produção de enzimas lipolíticas e sua eficiência de algumas espécies desse gênero, como, *P. aeruginosa* e *P. putida* isoladas do meio ambiente, em águas residuárias (MITTELBACH, 1990; DHARMSTHITI e KUHASUNTISOOK, 1998; BRAHIMI-HORN et al., 1991).

Os tratamentos com os resíduos utilizados neste experimento apresentaram uma diminuição do pH no decorrer de 30 dias de experimento, e a maior diminuição

---

ocorreu no óleo de fritura com aplicação da lipase comercial que apresentou pH=4,75 no início do experimento e pH=4,51 após 1 mês. A diminuição do pH do substrato pode ser explicada pela hidrólise de triacilgliceróis pelas lipases no meio, liberando com isso ácidos graxos.

Observou-se também, a diminuição no teor de sólidos voláteis em todas as condições de tratamento, que ocorreu em virtude da degradação dos compostos orgânicos presentes no sistema de respirometria, transformados em biomassa e em CO<sub>2</sub>.

Os melhores resultados de decaimento de O&G dentre todos os tratamentos e de todos os testes foram com a lipase comercial. De acordo com Gupta, R.; Gupta, N. e Rathi (2004), a lipase pura oferece primorosos resultados de degradação de O&G para o tratamento de efluentes gordurosos tendo em vista sua grande especificidade e capacidade de hidrolisar os lipídeos presentes nesses efluentes. Acerca disso, a aplicação de um processo prévio para hidrolisar e dissolver altos teores de gorduras melhora a degradação biológica de águas residuais, acelerando o processo e reduzindo o tempo de tratamento. No entanto, o pré-tratamento de hidrólise tem sido testado em lodos ativados ou resíduos urbanos. O tratamento de tais efluentes de várias origens é uma nova e promissora área de atuação para lipases (CAMMAROTA e FREIRE, 2006). Lipases de *Candida rugosa* foram usadas no tratamento de águas residuais domésticas e na limpeza de sistemas de esgotos e sumidouros (JAEGER e REETZ, 1998). A utilização de lipases comerciais a partir de diversas fontes (animal, vegetal e microbiana) no pré-tratamento de efluentes matadouros (MASSE, KENNEDY e CHOU, 2001) e da utilização de lipases de *Pseudomonas aeruginosa* nos efluentes de restaurantes (DHARMSTHITI e KUHASUNTISUK, 1998) também foram investigados.

---

## ***6. CONCLUSÕES***

Foi isolado um total de 24 cepas bacterianas, a partir de resíduos oleosos oriundos de dispositivos de retenção de gordura. Destas, 18 foram selecionadas pelo método de rodamina-B como bactérias lipolíticas e especificadas como “C1” a “C8”; “C10” a “C13”; “B1”; “R1”, “R2”, “R4”, “R6”, “R7”, somadas a cepa comercial “J”, demonstrando que estes dispositivos são uma fonte importante dessas bactérias.

A atividade lipolítica dos isolados bacterianos evidenciou uma resposta diversificada variando de 0,02 U/mg a 3,25 U/mg de proteína. A atividade lipolítica encontrada neste estudo para as cepas C1 e B1 (120 horas de enriquecimento a 28°C e 120 rpm) está dentro da faixa de atividade lipolítica da literatura.

As cepas que apresentaram maior atividade lipolítica por espectrofotometria demonstraram maior crescimento nas placas com rodamina-B, desta forma a rodamina-B se demonstrou um bom pré-seletor, pois obteve correlação com a atividade lipolítica.

No experimento de respirometria, pode-se observar que, as cepas mostraram diferentes potenciais de biodegradação, e que estes diferentes potenciais estão relacionados à atividade lipolítica das cepas quantificada por espectrofotometria.

As maiores produções de CO<sub>2</sub> foram observadas para os tratamentos com a lipase comercial, seguida pelas cepas C1 e B1, variando de 313,64 a 1563,89 mg de CO<sub>2</sub>. Essas taxas representam o resíduo da caixa de gordura do R.U. sem inóculo e o tratamento do resíduo da ETE-UFES com lipase comercial, respectivamente.

Nos estudos de decaimento de O&G a cepa C1 confirmou os resultados obtidos nos ensaios respirométricos, e na avaliação da atividade lipolítica e obteve taxas de redução de O&G de 87,23% combinada com o resíduo de caixa de gordura da ETE-UFES. Os dados de decaimento de pH e SV corroboraram os outros dados.

As metodologias empregadas permitiram a obtenção de correlações entre atividade lipolítica de cepas bacterianas, a produção de CO<sub>2</sub> e o decaimento de O&G, satisfazendo a hipótese de trabalho.

---

## ***7. RECOMENDAÇÕES***

Para dar continuidade aos estudos que envolvem o tratamento enzimático e aeróbio de resíduos com elevados teores de gordura provenientes de restaurantes, residências, entre outros, sugere-se:

- Testar inóculos mais concentrados nos tratamentos do estudo de respirometria e decaimento de O&G, a fim de verificar qual a concentração ideal de inóculo;
  - Detectar qual substância pode estar diminuindo a atividade da lipase quando se utiliza resíduos oleosos e ou gordurosos como substrato;
  - Testar enzimas imobilizadas;
  - Avaliar a atividade lipolítica dos microrganismos remanescentes no sistema de respirometria aeróbia com a finalidade de descobrir qual a contribuição destes na degradação de O&G em ácidos graxos.
-

## ***8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

ADAMCZAK, M., BEDNARSKI, W. Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. **Process Biochemistry**, 39, p. 1347-1361, 2004.

ADLERCREUTZ, P., Enzyme-catalyzed lipid modification. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.12, p.231-254,1994.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. Resolução nº 42. Disponível em: <<http://www.anp.org.br>>. Consultado em setembro de 2008.

**ALEXANDER, M.**; Biodegradation and Bioremediation, **Academic Press**, New York, p. 17-38, 1994.

ANDREOTTOLA, G; OLIVEIRA, E. L.; FOLARODI, P.; DALLAGO, L.; PETERLINI, R.; CADONNA, M. Método respirométrico para o monitoramento de processos biológicos; **Engenharia sanitária ambiental**. Vol.10 - Nº 1, 14-23, 2005.

APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19. ed. Washington, EUA, p.2-53, 2-58; 4-65; 5-2, 5-17, 5-30, 5-36, 1995.

AZBAR, N.; YONAR, T. Comparative evaluation of a laboratory and full-scale treatment alternatives for the vegetable oil refining industry wastewater. **Process Biochemistry**. v.39, p.869-875, 2004.

BECKER, P.; KOSTER, D.; POPOV, M. N.; MARKOSSIAN, S.; ANTRANIKIAN G.; MARKL, H. The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic conditions. **Water Research**. Vol. 33, No. 3, pp. 653-660, 1999.

---

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**. 7; vol.72; p.248–254,1976.

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretária de Tecnologia Industrial, **Produção de Combustíveis Líquidos a Partir de Óleos Vegetais**; Brasília; STI/CIT; 364 p.; 1985. Acessado em 11/12/2008.

CAMMAROTA, M. C.; TEIXEIRA, G.A.; FREIRE, D.M.G. Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1591-1595, 2001.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content; **Bioresource Technology**. v.97, p.2195–2210, 2006.

CASEY, J; MACRAE, A. Biotechnology and the oleochemical industry. **Inform**, v.3 (2), p.203-207, 1992.

CASTRO, H.F. de; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C dos. Modificações de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27,n.1, p.146-156, 2004.

CERNIA, E. PALOCCI, C. SORO, S. The Role of the Medium in Lipase-Catalyzed Esterifications and Transesterifications; **Chemistry and Physics of Lipids**. V. 93; 157-168; 1998.

CHRÓST, R. J., GAJEWSKI, A., LALKE, E. Mechanisms and control of microbiological processes of degradation and utilization of organic matter in lacustrine ecosystems of different degree of eutrophication (in Polish). **Journal of Biotechnology**, 3, p. 82-95, 1994.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). L6.350 - Solos – Determinação da biodegradação de resíduos – Método Respirométrico de Bartha, 1990.

---



CONAMA 357 – Conselho Nacional de Meio Ambiente, Legislação Ambiental Federal, Resolução n° 357, 2005. Disponível em: [www.mma.gov.br/conama/](http://www.mma.gov.br/conama/) Acesso em : Julho de 2008.

COSTA NETO, P. R. Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja. 2002. **Tese de Doutorado** – Curso de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, Santa Catarina, 2002.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de Biocombustíveis Alternativo ao Óleo Diesel Através da Transesterificação de Óleo de Soja Usado em Frituras. **Química Nova**. Vol. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.

COSTAS, M.; DEIVE, F. J.; LONGO, M. A. Lipolytica activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. **Process Biochemistry**, v.39, p. 2109-2114, 2004.

COSTA, V. E. U; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente, **Química Nova**, v.22(6), p. 863-873, 1999.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MYIASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. Entendendo a Gordura – os ácidos graxos. 1ª Edição, São Paulo, Manole, p.36, 2002.

CYGLER, M.; GROCHULSKI, P.; KAZLAUSKAS, R. J.; SCHRAG, J. D.; BOUTILLIER; F.; RUBIN, B.; SERREQUI, A. N.; GUPTA, A. K.; A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases. **Journal of the American Chemical Society**. 116(8), 3180-3186, 1994.

D'ALMEIDA, M. L. O.; VILHENA, A. Lixo municipal: Manual de Gerenciamento Integrado. 2. ed. (rev. e ampl.). Sao Paulo: IPT - CEMPRE, p.143-155, 2000.

DHARMSTHITI, S., KUHASUNTISUK, B.; Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: Biochemical properties and application for wastewater treatment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 21, 75–80, 1998.

---

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. (Ed). **Microbiologia Ambiental**. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, p. 269-292, 1997.

DURLI, E; Tratamento de efluentes de indústria de laticínios utilizando lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11; **Dissertação de Mestrado**; Curso de Pós-graduação em Química; Universidade Federal do Paraná, p. 21-34, 2007.

ESPINOSA, L. M.; STEPHENSON, T. Grease biodegradation: is bioaugmentation more effective than natural populations for start-up? **Water Science and Technology**, v. 37, n 5-6, p. 303-308, 1996.

Esquema de extração em Soxhlet. Disponível em: <<http://www.qmc.ufsc.br/organica/exp7/images/estrator01.gif>>. Acesso em: 26 jun. 2008.

FERRARI, R.A., OLIVEIRA, V.S., SCABIO, A. Biodiesel de soja — Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia, **Química Nova**, vol.28, no.1, 2005.

FIRME, L. P.; Cinética de degradação microbológica de torta de filtro no solo na presença de cádmio e níquel; **Dissertação de Mestrado**; Curso de Pós-graduação em Agronomia; Universidade de São Paulo, p. 38-42, 2005.

FRASER, CM ;DUJON, B, The genomics of microbial diversity: Editorial overview, **Current Opinion in Microbiology**, 3:p. 443–444, 2000.

FREIRE, R. S., PELEGRINI, R., KUBOTA, I. T., DURÁN, N., PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, 23 (4), p. 504-511, 2000.

GAVALA, H. N.; KOPSINIS, H.; SKIADAS, I. V.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G.; Treatment of dairy wastewater using an upflow anaerobic sludge

---

blanket reactor. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v.73, p.59-63, 1999.

GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, A. L. A.; OLIVEIRA, M. N.; Hidrolise parcial enzimática da gordura de babaçu. Campinas: **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. vol. 19, nº. 2, p. 270-276,1999.

GRAMPONE, M. A. Propriedades dos óleos vegetais modificados por hidrogenação, interesterificação e fracionamento. **Óleos & Grãos**, 15, 5-9, 1993.

GUISÁN, J.M; BASTIDA, A; CUESTA, C; FERNANDEZ-LAFUENTE, R; ROSELL, C. M, Immobilization-stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 1144-1152, 1991.

GUISÁN, J.M, ALVARO, G, LAFUENTE, R.F, ROSEL, C.M., GARCIA, J.L E TAGLIANI, A., Stabilization of heterodimeric enzyme by multipoint covalent immobilization: Penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 455-464, 1993.

GUNSTONE, F. D.; Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids; **Journal of the Science of Food and Agriculture**; v. 79, p.1535 - 1549, 1999.

GUPTA, R.; GUPTA, N; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, p. 763–781, 2004.

HABA, E., BRESCO, O., FERRER, C., MARQUES, A., BUSQUETS, M., MANRESA, A. Isolation of lipase-screening bacteria by deploying used frying oil as selective substrate, **Enzyme and microbial technology**, 26, p. 40 - 44, 2000.

HAMMOND, E. G.; GLATZ, B. A. Optimization of banana juice fermentation for the production of microbial oil. **Applied and Environmental Microbiology** 54(3):748–752, 1988.

---

HANKIN, L. AND ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia** 67, 597-607, 1975.

HANKIN, L., ZUCKER, M. AND SANDS, D. C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied Microbiology** 22, 205-209, 1971.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, Vol. 39, p. 235-251, 2006.

HOOVER, R.; LAURENTIUS, S.F., GUNETILEK, K.G. Spoilage of coconut oil. Purification and properties of fungal lipase that attacks coconut oil. **Journal of American Oil Chemists Society**. v.50, n.3, p.64-67, 1973.

HWU, C-S., TSENG, S-K., YUAN, C-Y., KULIK, Z. AND LETTINGA, G.; Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. **Water Research**. 32, 1571–1579, 1998.

JAEGER, K-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K-E., DIJKSTRA, B. W., REETZ M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annu. Review of Microbiology**, 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.-E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B. W., COLSON, C., VAN HEUVEL, M. AND MISSET, O.; Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, 151, 29±63. 1994.

JAEGER, K.E., REETZ, M.T., Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnology**. 16, 396–403, 1998.

---

JANDA, K; The lipolytic activity of *Thermomyces lanuginosus* strains isolated from different natural sources. **International Biodeterioration & Biodegradation**. Vol. 55, p.149–152, 2005.

JORDÃO, E.P.; PESSOA, C.A.; Tratamento de esgotos domésticos, 4 ed, Rio de Janeiro: ABES, p.131-138, 1995.

JUNG, W.H.; KIM, H.K.; LEE, C.Y.; OH, T.K. Biochemical properties and substrate specificity of lipase from *Staphylococcus aureus* B56. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 25-30, 2002.

JUNG, Y.J.; LEE, J.K.; SUNG, C.G., OH, T.K.; KIM, H.K. Nonionic detergent-induced activation of an esterase from *Bacillus megaterium* 20-1. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, p. 223–229, 2003.

KANWAR L.; GOSWAMI, P.; Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, vol 31, p 727-735, 2002.

KNOTHE, G. The history of vegetable oil-based diesel fuels. In: KNOTHE, G.; KRAHL, J.; VAN GERPEN, J. (eds.). **The Biodiesel Handbook**. Illinois: AOCS Press. pp. 4-16, 2005.

KORNBERG, A. Why purify enzymes? **Methods Enzimology**, v. 182, p.1-5, 1990.

KRISHNA, S. H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. **Biotechnology Advances**, 20, p. 239-267, 2002.

KUCEK, K. T. Otimização da transesterificação etílica do óleo de soja em meio alcalino. **Dissertação de Mestrado em Química** – Universidade Federal do Paraná, pp. 95, 2004.

---

LEAL, M.C.C.R.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C.; SANT'ANNA JR, G.L. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, Vol. 41, p. 1173-1178, 2006.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2 ed. Savier: São Paulo, p.179-198, 1995.

LI, N-W.; ZHONG, M-H.; WU, H.; Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from *Penicillium expansum*, **Process Biochemistry**, vol. 44, 6, p. 685-688, 2009.

LIMA, V.M.G; Produção e purificação de lipases e sua utilização em biocatálise em solventes orgânicos. **Tese de Doutorado em Ciências (Bioquímica)** - Universidade Federal do Paraná, 2004.

LINKO, Y. Y.; LAMSA, M.; HUHTALA, A. and LINKO, P. Lipase-Catalyzed Transesterification of Rapeseed Oil and 2-Ethyl-1-Hexanol, **Journal of the American Oil Chemists' Society**. V. 71; n. 12; 1411-1414; 1994.

LIU, C.-H., CHANG, J.-S., Lipolytic activity of suspended and membrane immobilized lipase originating from indigenous *Burkholderia sp.* C20., **Bioresource Technology** V. 99, 6, p.1616-1622, 2007.

LOWRY, Q. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193, p. 265 - 275, 1951.  
MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

MADEJÓN, E.; ROMERO, A. S.; LÓPEZ, R.; CABRERA, F.; Characterization of the wastewater from the two-phase centrifugation system for olive oil extraction, **Nutrient and Carbon Cycling in Sustainable Plant-Soil Systems**. p.185-188, 1998.

---

MAIA, M.M.D.; HEASLEY, A; CAMARGO DE MORAIS, M.M.; MELO, E.H.M.; MORAIS JR., M.A.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA FILHO, J.L.; Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation, **Bioresource Technology**, 76, p.23-27, 2001.

MARLOT, C.; LAUGRAND, G.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BRATTI, J. Ester synthesis in organic solvent catalized by lipases immobilized on hydrophilic supports. **Biotechnology Letters**, v. 7, p. 647-650, 1985.

MASSE´, L., KENNEDY, K.J., CHOU, S.; Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for oil particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**. v.77, p.145–155, 2001.

MASSE, L.; MASSE, D.I.; KENNEDY, K.J.; CHOU, S. Neutral fat hydrolysis and long-chain fatty acid oxidation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. **Biotechnonology and Bioengineering**. Vol. 79 p. 43-52, 2002.

MENDES, A. A., CASTRO, H. F., PEREIRA, E. B.; 2006. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, n.2, p. 143-149, 2006

MITTELBAACH, M.; TRITTHART, P.; Diesel fuel derived from vegetable oils, iii. emission tests using methyl esters of used frying oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society** , v.65, p.1185, 1988.

MITTELBAACH M. Lipase Catalyzed Alcoholyses of Sunflower Oil, **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 67; n. 3; 168-170; 1990.

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMSTHITI, S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**. Vol. 50, p. 101-105, 2002.

---

MORAIS, J.L. Estudo da potencialidade de processos oxidativos avançados, isolados e integrados com processos biológicos tradicionais, para tratamento de chorume de aterro sanitário. Curitiba. **Tese de Doutorado** (Universidade Federal do Paraná). 229f, 2005.

MUDRYK, Z. J., SKÓRCZEWSKI, P. Occurrence and activity of lipolytic bacterioneuston and bacterioplankton in the estuarine lake Gardno. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 51, p. 763-772, 2000.

MURAKAMI, M.; KAWASAKI, Y.; KAWANARI, M.; Tranesterification of Oil by Fatty Acid-Modified Lipase, **Journal of the American Oil Chemists' Society**. V. 70; n. 571-574; 1993.

MUSTRANTA, A, FORSELL, P. E POUTANEN, K, Applications of immobilized lipases to transterification and esterification reactions in nonaqueous systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 133-139, 1993.

NELSON, L. A .; FOGLIA, T. A.; and MARMER, W. N. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel; **Journal of the American Oil Chemists' Society**. V. 73; n. 8; 1191-1195; 1996.

NYE, M. J. T. W.; WILLIAMSON, S.; DESHPANDE, J. H.; **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v.60, p.1598, 1983

OGINO, H. NAKAGAWA, S.; SHINYA, K.; MUTO, T.; FUGIMURA, N.; YASUDA, M.; ISHIKAWA, H. Purification and characterization of organic solvent stable lipase from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, p. 451-457, 2000.

OLIVEIRA, A. L.; **Conferência de Ciência e Tecnologia Avícola**, Curitiba, 1995.

OMIL, F.; GARRIDO, J.M.; ARROJO, B.; MENDEZ, R. Anaerobic filter reactor performance for the treatment of complex dairy wastewater at industrial scale. **Water Research**. Vol. 37, p. 4099-4108, 2003

---



OSTERBERG, E. BLOMSTROM, A-C. and KOLMBERG, K. Lipase Catalyzed Transesterification of Unsaturated Lipids in a Microemulsion; **Journal of the American Oil Chemists' Society**. V. 66; n. 9; 1330-1333; 1989.

OSWAL, N.; SARMA, P.M.; ZINJARDE, S.S. e PANT, A. Palm oil mill effluent treatment by a tropical marine yeast. **Bioresource Technology**, vol. 85, no. 1, p. 35-37, 2002.

OTERO, C., FERNÁNDEZ-PÉREZ, M., PÉREZ-GIL, J. Effects of interactions with micellar interfaces on the activity and sturcture of different lipolytic isoenzymes from *Cândida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, 37, p. 695-703, 2005.

PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G., MATEO, C.; SEGURA, R. L.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Purification, Immobilization, Hyperactivation, and Stabilization of Lipases by Selective Adsorption on Hydrophobic Supports. **Methods in Biotechnology**, v. 22, p. 143-152, 2006.

PANDEY, A. Lipases. In: Kademi, A.; Leblanc, D., Houd, A.; **Concise Encyclopedia of Bioresource Technology**. The Haworth Pres,. New York: p.552-560, 2004.

PEDROTI, G. I.; Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solo; **Dissertação de Mestrado** em Engenharia Ambiental; Curso de Pós-graduação em Engenharia Ambiental; Universidade Federal do Espírito Santo; 2007.

PETERSON, C. L.; COOK, J. L.; THOMPSON, J. C.; TABERSKI, J. S.; Continuous flow biodiesel production; **Applied Engineering in Agriculture**. Vol. 18(1): p.5–11, 2002.

PEREIRA, E. B. Tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas. **Tese de Doutorado** (Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFSC, 2004.

---

PIRES, M. J. R. The Heterogeneous Formation of N<sub>2</sub>O in the Presence of Sulfur-containing Gases: Experiments and Modeling. **Thèse de Docteur** és Sciences. École Polytechnique Fédérale de Lausanne. 18 p.; 1995.

QUEIROZ, S. L. e BATISTA, A. A. Funções Biológicas do Óxido Nítrico. **Química Nova**; vol. 22; no. 4; 584 – 590; 1999.

RAHMAN, R.N.Z.R.A.; LEOW, T.C.; SALLEH, A.B.; BASRI, M. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. **BMC Microbial**, v. 7, p. 77, 2007.

RAMÍREZ, I.J.D.; A, ESPINOSA, E. E.; TORRES, E. F.; ROJAS, M. G.; SAAD, H. R.; Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE, **International Biodeterioration & Biodegradation**. 62, 21–30, 2008.

RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. K.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H. M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v.31, p.28-37, 2003.

REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, 6, p. 145-150, 2002.

REEVE, R. N.; **Environmental Analysis**, Analytical Chemistry by Open Learning, John Wiley & Sons, ACOL Office, London, p.263,1994.

RESLOW, M., ADLERCREUTZ, P. E MATTIASSON, B., Selection of Solvents for Bioorganic Synthesis. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 9, p. 250-254, 1988.

RODELLA, A. A.; SABOYA, L. V.; Calibration for conductimetric of carbon dioxide. In: **Soil Biology and Biochemistry Journal**. USA: Elsevier; p.2059-2060, 1999.

---

ROSA, D. R. Tratamento Enzimático/Biológico de Efluentes com Alto Teor de Gordura, Rio de Janeiro. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro). p.37-45, 2004.

ROWE, L.; HOWARD, G.T. ; Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme; **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 50,p.33 – 40 2002.

SAAD, E. B.; Etanolise do Óleo de Milho Empregando Catalisadores Alcalinos e Enzimáticos; Paraná; **Dissertação de Mestrado em Química**; Curso de Pós-graduação do Instituto de Química; Universidade Federal do Paraná; 2005.

SALUM, T. F. C.; BARON, A. M.; ZAGO E. C.; TURRA, V. ; BARATTI, J. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. An Efficient System for Catalyzing Ester Synthesis Using a Lipase from a Newly Isolated *Burkholderia cepacia* Strain. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, p. 197-203, 2008.

SAXENA, R.K., SHEORAN, A., GIRI, B., DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiology Methods**. v. 52, p.1 - 18, 2003.

SCHWAB, A.W.; BAGBY, M.O.; FREEDMAN, B. Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. **Fuel**, v. 66, p. 1372-1378, 1987.

SEBRÃO, D.; SILVA, V.D.; NASCIMENTO, M.G.; MOREIRA, M.A. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1182-1187, 2007.

SEMIONATO, S; Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura; **Dissertação de Mestrado**; Curso de Pós-graduação em Engenharia Ambiental; Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.

SERCHEL, R. and VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review, **Journal of the Brazilian Chemical Society**. V. 9; n.. 1; 199-210; 199-210;.1998.

---

SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, 19, p. 627-662, 2001.

SHAW, J.F; CHANG, R.C; WANG, F. F. E.; WANG, Y. J.; Lipolytic Activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 132-137, 1990.

SHAY, E. G. Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunities. **Biomass and Bioenergy**, v. 4, p. 227-242, 1993.

SILVA, C. H. P. M. Bacteriologia: um texto ilustrado. Teresópolis, RJ: Eventos. p.37-38, 105-109, 1999.

SILVA, R. C.; GIOIELLI, L. A.; Lipídios estruturados: alternativa para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano. **Química Nova**, Vol. XY, No. 00, 1-9, 200, 2009.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; Fundamentals of Analytical Chemistry. 7.ed. Philadelphia, Saunders, 1996. p.870.

STARK, M.B E HOLMBERG, K.; Covalent immobilization of lipase in Organic Solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 942-950, 1989.

STOURNAS, S.; LOIS, E. and SERDARI, A. Effects of Fatty Acid Derivatives on the Ignition Quality and Cold Flow of Diesel Fuel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 72; n. 4; 436-437; 1995.

SUGIMORI, D.; NAKAMURA, M.; MIHARA Y. Microbial Degradation by Acinetobacter sp. Strain SOD-1. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**. 66 (7), 1579-1582p, 2002.

URGEL, A.L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos, vol. 3. São Paulo: Edgard Blucher. p.391-403, 2001.

---

VALLADÃO, A.B.G.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C. Enzymatic prehydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Vol. 60, p. 219-225, 2007.

VAN GERPEN, J.; KNOTHE, G. Basics of the transesterification reaction. In: KNOTHE, G.; KRAHL, J.; VAN GERPEN, J. (eds.) **The Biodiesel Handbook**. Illinois: AOCS Press. p. 26-41, 2005.

VECCHIA, R.D.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V., Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, p.623-630, 2004.

VIDAL, G.; CARVALHO, A.; MENDEZ, R.; LEMA, J.M. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. **Bioresource Technology**. Vol. 74, p. 231-239, 2000.

VON SPERLING, M. Princípios do Tratamento biológico de águas residuárias – Lodos Ativados. Departamento de Engenharia Sanitaria e Ambiental - UFMG - Belo Horizonte, Vol. 4, 2ª ed., p.87, 1997.

WAKELIN, NG ; FORSTER , CF - An investigation into microbial removal of fats, oils and greases, **Bioresource Technology**, Vol.59, No.1, p.37-43, 1997

WATANABE, Y.; MIYAWAKI, Y.; ADACHI, S.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R. Equilibrium constant for lipase-catalyzed condensation of mannose and lauric acid in water-miscible organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 494-498, 2001.

WILLEY, R. Fats, oils and greases: The minimization and treatment of wastewaters generated from oil refining and margarine production. **Ecotoxicology and Environmental safety**, vol. 50, p 127-133, 2001.

---

WINKLER, U. K., STUCKMANN, M., Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, 138, p. 663 - 670, 1979.

WISDOM, R.A.; DUNNILL, P.; LILLY, M.D.; Enzymic Interesterification of fats: Laboratory and Pilot- Scales Studies with Immobilized Lipase from *Rhizopus arrhizus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p. 1063-1069, 1990.

WU, X. Y.; JAASKELAINEN, S. and LINKO, Y. Y. An Investigation of Crude Lipases for Hydrolysis, Esterification, and Transesterification, **Enzyme Microbiology Technology**; 19; 226-231; 1996.

ZAGONEL, G. F.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; RAMOS, L. P. Estudo de otimização da reação de transesterificação etílica do óleo de soja degomado. **Ciência e Tecnologia**, v. 12, p. 35-41, 2003.

YEE, L. N.; AKOH, C. C. and PHILLIPS, R. S. Lipase PS-Catalyzed Transesterification of Citronellyl Butyrate and Geranyl Caproate: Effect of Reaction Parameters, **Journal of the American Oil Chemists' Society**; v. 74; n. 3; 255-260; 1997.

---

# *ANEXOS*

## **ANEXO A**

### **MATERIAL**

- Erlenmeyers de vidro de 125 e 250 mL;
  - Óleo de soja comercial (Liza<sup>®</sup>, Brasil);
  - Fungicida comercial Nistatina (Micostatin, B-MS, EUA);
  - Cloreto de sódio (NaCl - Synth, Brasil);
  - Sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> - Synth, Brasil);
  - Hidrogenofosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - Synth, Brasil);
  - Fosfato monobásico de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Synth, Brasil);
  - Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O - Synth, Brasil);
  - Agar-Agar (Merck, Alemanha);
  - Tween 80 (Vetec, Brasil);
  - Placas de Petri;
  - Rodamina B (C.I. 45170 – Synth, Brasil);
  - Luz U.V. (Spectroline model EA – 160, EUA);
  - Vermelho de metila (Reagen, Brasil);
  - Cristal violeta (Laborclin, Brasil)
  - Solução de lugol (Laborclin, Brasil)
  - Solução de etanol + acetona 50% v/v (Laborclin, Brasil);
  - Safranina (Laborclin, Brasil);
  - Microscópio Meiji (ML7100, Japão);
  - Peptona (Oxoid, Brasil);
  - Dextrose (Reagen, Brasil);
  - Hidrogenofosfato dipotássico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – Quimex, Brasil);
  - Alça de inoculação;
  - Bico de Bunsen;
  - Álcool etílico 96° (QM, Brasil);
  - Lâmina de vidro;
-

- Lápis dermatográfico Mitsubishi 7600;
  - Água destilada;
  - Plasma de coelho;
  - L-Triptofano (Merck, Alemanha);
  - Tubos de ensaio;
  - Reativo de Kovac's (Newprov, Brasil);
  - Peróxido de hidrogênio (Cromoline, Brasil);
  - Centrífuga Hettich (modelo D78532, Alemanha);
  - Coomassie Blue G250 (Merck, Alemanha);
  - Ácido fosfórico 85% (Vetec, Brasil);
  - Papel de filtro Whatman® n.º. 1 (Inglaterra);
  - Soro de albumina bovina (BSA, Sigma, EUA);
  - Vórtex mixer (Vision Scientific co., LTD, VS-1300V, Korea);
  - Espectrofotômetro (Ultrospec 1000, Inglaterra);
  - p-Nitrofenil palmitato (Sigma, EUA);
  - Isopropanol (Quimex, Brasil);
  - Deoxicolato de sódio (Sigma, EUA);
  - Goma arábica (Synth, Brasil);
  - Areia;
  - Vermiculita (Plantax, Brasil);
  - Peneira de malha 2 mm (ABNT);
  - Cartuchos de extração soxhlet 25 x 80 mm (LCT, Brasil);
  - Ácido clorídrico (HCl – Quimex, Brasil);
  - Liofilizador (Labconco Freezone®, modelo 7752020 , EUA);
  - Lipase comercial AK Amano 20 (Amano Co., Japão);
  - Condutivímetro Jenco (modelo 1671, China);
  - Extrator de óleos e graxas Marconi (modelo MA 491, Brasil);
  - Incubadora Shaker Nova Técnica (modelo NT 712, Brasil);
  - Estufa Ética (modelo 411D, Brasil);
  - Autoclave Bio Eng (modelo A75, Brasil);
  - Banho Maria Grant (model Y28, Inglaterra);
  - pHmetro Onda Científica (modelo TCP01, Brasil).
-



## ANEXO B

Tabela 10 – Estatística descritiva para os dados de Concentração de O&amp;G (mg/100g de substrato)

	0 dias			15 dias			30 dias		
Tratamento	Média	D. P.	C. V.	Média	D. P.	C. V.	Média	D. P.	C. V.
R	438,3333333	0,115470054	0,002634298	355	2,137755833	0,060218474	336	0,1	0,00297619
RC	406,6666667	0,2081666	0,005118851	266,6666667	2,540341184	0,095262794	213,3333333	0,763762616	0,035801373
RB	411,3333333	0,907377173	0,022059413	275	2,095232684	0,076190279	224,3333333	0,152752523	0,006809176
RE	361,3333333	0,321455025	0,008896357	239,3333333	1,193035345	0,049848273	164,3333333	0,115470054	0,007026575
RJ	421,3333333	0,404145188	0,009592054	278,6666667	1,950213664	0,069983744	250,3333333	0,550757055	0,022000948
RR	415,6666667	0,4163332	0,010016035	275	1,808314132	0,065756878	236,6666667	0,702376917	0,029677898
D	302	0,458257569	0,015174092	122	1,081665383	0,088661097	121	0,2	0,016528926
DC	268,6666667	0,75055535	0,027936303	85	0,360555128	0,04241825	76,6666667	0,351188458	0,04580719
DB	276,3333333	0,321455025	0,011632872	89	0,8	0,08988764	85,3333333	0,450924975	0,052842771
DE	264	0,8	0,03030303	71,33333333	0,404145188	0,056655868	51,6666667	0,115470054	0,022349043
DJ	287,6666667	2,302896727	0,080054347	106	0,435889894	0,041121688	103	0,6	0,058252427
DR	280,6666667	1,582192572	0,056372657	101	0,754983444	0,074750836	93,3333333	0,493288286	0,052852316
L	338	1,113552873	0,032945351	263,6666667	2,444040371	0,092694325	229,6666667	0,115470054	0,005027724
LC	302	1,053565375	0,034886271	161	1,571623365	0,097616358	143,3333333	0,2081666	0,014523251
LB	307	1,1	0,035830619	189	0,953939201	0,050472974	172,3333333	0,4163332	0,0241586
LE	299	1,907878403	0,063808642	145	1,058300524	0,072986243	124,6666667	0,351188458	0,028170197
LJ	319,3333333	1,975685535	0,061869067	221	1,777638883	0,080436149	196,3333333	0,450924975	0,022967316
LR	311,6666667	2,023198787	0,064915469	206	1,322875656	0,064217265	181	0,5	0,027624309
O	478,3333333	1,955334583	0,040878075	325,6666667	1,761628035	0,05409298	301	0,5	0,016611296
OC	446,6666667	4,106498914	0,091936543	256,6666667	1,266227994	0,049333558	200,3333333	0,56862407	0,028383897
OB	451,3333333	2,746512941	0,060853315	265	0,6	0,022641509	219,6666667	0,808290377	0,036796224
OE	401,3333333	3,453018004	0,086038655	229,3333333	0,65064071	0,028370961	125,3333333	0,251661148	0,020079347
OJ	455,6666667	2,15019379	0,047187867	289,3333333	2,514623895	0,086910964	260,3333333	0,503322296	0,019333763
OR	461,3333333	3,622614157	0,078524873	258,6666667	0,8326664	0,032190711	229	0,529150262	0,023106998

Tabela 11– Estatística descritiva para os dados de Respirometria Aeróbia

Tratamento	1 dia			2 dias			3 dias			4 dias			5 dias		
	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.
<b>R</b>	314,9202	190,0459	0,603473	430,20339	201,7691	0,469009	457,6695	205,67989	0,449407	479,9888	204,5392	0,426133	594,342	196,8334	0,331179
<b>RB</b>	152,9404	105,0229	0,686692	201,23477	98,84594	0,491197	223,125	95,334909	0,427271	241,8278	92,71854	0,383407	312,1269	48,92575	0,15675
<b>RC</b>	129,9786	81,36963	0,626023	233,73351	79,63235	0,340697	258,7215	76,552227	0,295887	278,3542	75,20492	0,270177	392,1867	77,33894	0,197199
<b>RR</b>	195,1237	76,55692	0,392351	237,80969	61,32817	0,257888	267,9604	59,788565	0,223125	297,7195	62,25625	0,20911	394,1595	67,2339	0,170575
<b>RJ</b>	217,2544	31,10284	0,143163	259,21333	44,23452	0,170649	290,7064	46,67616	0,160561	315,4023	47,22799	0,149739	410,3842	39,63743	0,096586
<b>RE</b>	210,0853	10,04717	0,047824	237,2963	12,48465	0,052612	261,8712	13,718259	0,052386	282,8473	15,32596	0,054185	319,4028	34,15905	0,106947
<b>D</b>	232,4237	17,82509	0,076692	310,73327	30,6032	0,098487	342,4329	33,313958	0,097286	363,4089	37,79465	0,104	488,5934	42,56708	0,087122
<b>DB</b>	201,2538	40,58599	0,201666	249,75587	26,36902	0,105579	272,6787	27,734474	0,101711	293,8614	30,23767	0,102898	330,1045	36,16031	0,109542
<b>DC</b>	70,34013	26,65408	0,378931	194,34751	32,04299	0,164875	229,9708	36,504113	0,158734	250,8435	37,89051	0,151052	372,487	41,39768	0,111139
<b>DR</b>	350,1422	10,433	0,029796	471,44922	18,39589	0,03902	500,4641	21,066202	0,042093	520,9235	26,8527	0,051548	633,298	35,97779	0,05681
<b>DJ</b>	67,01534	34,4692	0,514348	114,9981	36,22487	0,315004	133,0679	34,829208	0,26174	149,9107	32,77652	0,21864	227,9167	55,45364	0,243307
<b>DE</b>	196,7861	97,23135	0,494097	286,72783	112,8199	0,393474	317,0851	117,67727	0,371122	332,2746	121,7903	0,366535	461,3126	131,3056	0,284635
<b>O</b>	150,1351	105,9527	0,705715	181,50049	108,6074	0,598386	207,0047	110,115	0,531944	230,254	108,9128	0,473012	222,443	115,3928	0,518752
<b>OB</b>	181,409	160,5324	0,88492	298,66553	156,6261	0,52442	320,6591	157,16089	0,490118	338,8452	155,1986	0,458022	457,9892	159,6523	0,348594
<b>OC</b>	222,4494	48,63141	0,218618	260,56554	45,8234	0,175861	276,6735	44,433647	0,1606	299,9228	43,87299	0,146281	329,9171	78,26506	0,237226
<b>OR</b>	254,6583	86,73308	0,340586	379,70426	97,04063	0,255569	411,8169	100,98918	0,245228	429,4863	99,63299	0,231982	556,233	107,0543	0,192463
<b>OJ</b>	230,9692	26,2624	0,113705	259,21874	35,22286	0,135881	282,0383	36,681714	0,130059	296,9179	39,93861	0,134511	369,4041	61,87856	0,167509
<b>OE</b>	136,9399	56,83051	0,415003	235,91729	50,63116	0,214614	264,6225	48,492763	0,183253	284,3585	48,21241	0,169548	384,4436	65,8692	0,171336
<b>L</b>	181,8246	15,30927	0,084198	275,7129	14,37344	0,052132	282,6311	12,812423	0,045333	285,3176	12,28545	0,043059	385,4028	28,28965	0,073403
<b>LB</b>	2,493594	19,10287	7,660777	28,250571	11,12797	0,393902	37,85338	12,940718	0,341864	46,63644	13,74233	0,294669	133,3908	11,5135	0,086314
<b>LC</b>	54,75517	82,12807	1,499914	118,4206	81,29982	0,686534	125,2355	81,876764	0,653782	132,6753	84,40047	0,636143	259,7344	91,67537	0,352958
<b>LR</b>	233,5666	29,01539	0,124227	328,28585	28,42189	0,086577	336,3398	27,713087	0,082396	344,2962	29,72567	0,086337	444,1731	47,36821	0,106644
<b>LJ</b>	55,37857	44,94562	0,811607	97,545232	52,34004	0,536572	109,0066	55,887749	0,5127	123,6795	59,04732	0,477422	172,212	79,39245	0,461016
<b>LE</b>	217,5661	15,43147	0,070928	235,32593	15,58472	0,066226	243,8962	18,56404	0,076115	256,8125	18,10597	0,070503	255,8751	38,40412	0,150089

Tratamento	6 dias			7 dias			8 dias			9 dias			10 dias		
	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.
<b>R</b>	789,5965	416,1678	0,527064	831,72392	420,9215	0,506083	841,2546	421,22719	0,500713	870,3792	422,0874	0,484947	896,9408	423,173	0,471796
<b>RB</b>	358,1541	43,75777	0,122176	392,70468	35,63627	0,090746	407,3519	29,463873	0,07233	441,6988	21,5625	0,048817	562,1782	148,9059	0,264873
<b>RC</b>	460,2987	74,29521	0,161407	505,65893	71,66164	0,141719	523,0148	69,548894	0,132977	559,6717	66,02673	0,117974	592,8486	63,44376	0,107015
<b>RR</b>	458,2467	65,97287	0,143968	501,99055	64,3056	0,128101	514,23	64,887317	0,126183	544,2584	64,19802	0,117955	573,3259	62,4788	0,108976
<b>RJ</b>	466,1123	37,54087	0,08054	513,49298	36,90699	0,071874	525,0301	38,142971	0,072649	557,5693	40,20352	0,072105	586,737	42,08087	0,07172
<b>RE</b>	361,1988	35,41423	0,098046	404,8416	37,0782	0,091587	417,2817	39,431105	0,094495	448,6157	40,43934	0,090142	478,9862	41,96519	0,087613
<b>D</b>	553,8158	44,98403	0,081226	597,0545	45,58118	0,076343	613,0059	44,062505	0,071879	646,9511	42,19547	0,065222	674,515	38,61092	0,057242
<b>DB</b>	389,3413	31,50376	0,080916	429,95335	30,31017	0,070496	440,6879	28,176863	0,063938	472,9258	27,40203	0,057942	503,8977	25,78764	0,051176
<b>DC</b>	441,8375	40,82981	0,092409	485,98538	40,1707	0,082658	498,5258	40,53462	0,081309	533,7766	42,08994	0,078853	567,3545	45,18848	0,079648
<b>DR</b>	698,7268	42,16804	0,06035	737,82346	47,17544	0,063939	749,9626	50,490545	0,067324	777,7816	55,1223	0,070871	802,8397	59,11824	0,073636
<b>DJ</b>	275,6983	53,01279	0,192286	310,24886	51,7147	0,166688	315,9673	50,629834	0,160238	340,8738	51,64122	0,151497	361,3213	50,75986	0,140484
<b>DE</b>	519,4142	136,0758	0,261979	554,16678	139,9105	0,25247	563,2962	141,58781	0,251356	589,8096	143,1599	0,242722	612,1615	143,1577	0,233856
<b>O</b>	263,207	112,0607	0,425751	303,31393	112,8525	0,372065	313,5469	111,84026	0,356694	341,8681	111,3676	0,325762	368,129	110,0584	0,298967
<b>OB</b>	523,0052	157,5012	0,301147	562,60697	155,8415	0,276999	573,2412	155,43926	0,271159	603,0688	153,1575	0,253964	628,8286	152,004	0,241726
<b>OC</b>	372,7451	74,42567	0,199669	408,20484	77,31851	0,189411	422,852	81,047487	0,191669	455,4917	84,79406	0,186159	484,6593	86,75361	0,178999
<b>OR</b>	614,7475	111,7527	0,181786	649,50006	115,0337	0,177111	655,5194	117,87696	0,179822	681,129	121,3266	0,178126	702,9797	120,0724	0,170805
<b>OJ</b>	417,7017	67,95956	0,162699	452,75734	69,47718	0,153453	459,0777	72,57789	0,158095	481,7748	75,54604	0,156808	503,7257	80,2708	0,159354
<b>OE</b>	445,0221	65,31799	0,146775	481,9972	66,09241	0,137122	505,2722	65,973685	0,130571	530,8817	65,00566	0,122448	555,7394	61,63582	0,110908
<b>L</b>	447,942	30,58394	0,068277	484,81609	33,13792	0,068352	494,5474	34,048897	0,068849	521,2617	36,42615	0,069881	545,1171	37,35847	0,068533
<b>LB</b>	179,0052	16,25614	0,090814	217,59672	19,23063	0,088377	228,6323	21,889283	0,09574	256,6521	23,52043	0,091643	293,7382	11,5207	0,039221
<b>LC</b>	320,932	96,31421	0,300108	357,80616	98,7891	0,276097	367,7382	99,603198	0,270854	398,6705	101,3103	0,25412	424,4302	103,9422	0,244898
<b>LR</b>	505,3707	69,28868	0,137105	528,40438	84,67926	0,160255	539,8412	93,623319	0,173428	571,7778	100,8852	0,176441	598,4397	107,2119	0,179152
<b>LJ</b>	226,908	79,65808	0,351059	276,61227	84,65709	0,30605	290,6575	87,800646	0,302076	322,795	90,3702	0,279962	351,9626	92,84758	0,2638
<b>LE</b>	305,824	43,2466	0,14141	348,55752	46,74672	0,134115	359,9944	49,135128	0,136489	390,1232	52,87406	0,135532	417,3865	54,34091	0,130193
<b>DR</b>	365,7986	127,9955	0,349907	415,7049	124,8	0,300213	435,6692	120,99255	0,277717	479,0548	118,8854	0,248167	523,0569	115,4784	0,220776
<b>DJ</b>	571,354	1,116251	0,001954	650,3555	10,32974	0,015883	686,3715	17,020915	0,024798	744,922	21,01456	0,02821	799,4485	20,36977	0,02548

Tratamento	11 dias			13 dias			15 dias			17 dias			20 dias		
	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.
R	923,6478	423,9263	0,45897	972,22016	423,9928	0,436108	1167,195	432,88617	0,370877	1216,663	432,0459	0,355107	1272,74	430,8491	0,338521
RB	594,0866	143,9259	0,242264	648,96833	135,872	0,209366	734,1735	112,59605	0,153364	796,3563	107,0052	0,134368	885,5192	96,02303	0,108437
RC	624,4569	61,81754	0,098994	679,23848	58,16035	0,085626	875,8578	59,942715	0,068439	929,1006	58,22447	0,062668	1068,643	173,8221	0,162657
RR	600,2329	61,79279	0,102948	646,30152	60,22975	0,093191	734,7956	65,435215	0,089052	783,4691	64,54601	0,082385	841,445	62,10387	0,073806
RJ	613,744	44,81908	0,073026	662,71701	49,8419	0,075208	800,7514	87,340733	0,109073	856,5769	91,25932	0,10654	923,8489	97,13246	0,105139
RE	505,4931	42,95946	0,084985	554,26574	45,17668	0,081507	639,7792	34,324849	0,053651	694,7107	35,46729	0,051053	765,0814	34,86171	0,045566
D	701,4221	36,99748	0,052746	750,09457	34,25974	0,045674	932,5302	34,443735	0,036936	987,561	34,83835	0,035277	1052,434	37,4054	0,035542
DB	530,7047	26,02226	0,049033	579,47734	28,6941	0,049517	599,4168	32,707231	0,054565	654,7456	34,3223	0,052421	723,517	35,58692	0,049186
DC	596,4621	48,20308	0,080815	653,3468	52,5412	0,080419	824,6821	76,319963	0,092545	878,9182	79,84795	0,090848	941,7921	83,43825	0,088595
DR	827,4461	62,35933	0,075364	876,51923	71,15062	0,081174	1054,535	98,756378	0,093649	1099,732	106,0867	0,096466	1144,613	113,3661	0,099043
DJ	379,9261	49,4765	0,130227	416,38042	47,46899	0,114004	526,3557	90,32439	0,171603	570,9565	88,962	0,155812	608,6408	94,91487	0,155946
DE	633,367	143,2358	0,22615	715,28904	189,3523	0,264721	870,0767	213,26515	0,245111	909,8101	212,6729	0,233755	947,1945	212,712	0,224571
O	392,6354	109,0082	0,277632	435,59937	107,7131	0,247276	510,2181	144,87361	0,283944	551,6402	140,7551	0,255157	601,6194	132,7124	0,220592
OB	653,2349	150,8018	0,230854	701,00612	146,4933	0,208976	901,2228	137,09189	0,152118	947,4129	136,8296	0,144425	998,3917	136,7767	0,136997
OC	509,4658	88,50072	0,173713	556,13532	93,28319	0,167735	695,4031	110,67057	0,159146	746,0632	117,7467	0,157824	805,9383	124,5629	0,154556
OR	724,1852	120,8194	0,166835	762,74266	123,517	0,161938	892,0407	90,314868	0,101245	928,3968	94,77049	0,10208	963,3822	97,56104	0,101269
OJ	524,7312	84,42357	0,160889	561,9867	90,9145	0,161773	681,315	88,469388	0,129851	723,2338	95,12489	0,131527	766,1159	103,6826	0,135335
OE	576,5448	61,87982	0,107329	617,50585	60,50554	0,097984	778,0492	65,56565	0,084269	821,756	64,77041	0,07882	862,9388	64,79046	0,075081
L	566,2226	38,56197	0,068104	605,88165	39,56904	0,065308	795,1008	49,634103	0,062425	834,6356	51,53606	0,061747	876,1183	53,70582	0,0613
LB	317,4443	11,95235	0,037652	358,90612	13,05176	0,036365	464,7702	46,771173	0,100633	510,5629	46,28255	0,09065	562,5413	46,58478	0,082811
LC	446,436	104,3747	0,233796	487,29684	104,5278	0,214505	606,214	74,509306	0,122909	650,4175	72,71738	0,111801	695,3988	70,36571	0,101188
LR	621,6457	110,5689	0,177865	667,51408	116,0437	0,173845	828,8797	110,95271	0,133859	874,2751	118,0177	0,134989	925,5538	125,1262	0,135191
LJ	378,6696	94,99432	0,250863	419,63065	99,02666	0,235985	516,45	157,79791	0,305543	558,3688	160,0144	0,286575	607,7482	162,2221	0,266923
LE	441,8929	56,16806	0,127108	484,45629	60,95391	0,125819	613,3432	99,3636	0,162003	659,8313	101,9749	0,154547	712,3095	106,1516	0,149025
DR	565,2679	114,7287	0,202963	645,18696	116,5204	0,180599	734,195	104,50774	0,142343	842,8659	103,3207	0,122583	1019,492	102,1927	0,100239
DJ	845,5605	18,64639	0,022052	947,71269	7,881215	0,008316	1181,539	56,050177	0,047438	1307,99	98,1371	0,075029	1472,522	126,6341	0,085998

Tratamento	22 dias			24 dias			27 dias			29 dias			31 dias		
	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.	Média	D.P.	C.V.
<b>R</b>	1304,202	430,1984	0,329856	1332,9758	428,6712	0,32159	1374,609	426,0647	0,309953	1362,248	435,4062	0,319623	1398,936	433,1448	0,309624
<b>RB</b>	940,0535	91,64559	0,09749	991,00735	89,41748	0,090229	1066,486	88,551174	0,083031	1075,881	87,51841	0,081346	1129,381	91,34206	0,080878
<b>RC</b>	1105,498	174,1622	0,157542	1140,2667	174,2434	0,152809	1196,477	174,85515	0,146142	1199,344	194,7789	0,162404	1242,956	192,7122	0,155044
<b>RR</b>	874,9047	59,1206	0,067574	906,77579	58,32804	0,064325	953,9002	55,343816	0,058018	966,4595	71,95017	0,074447	994,4457	69,83838	0,070228
<b>RJ</b>	963,8008	101,3718	0,105179	1001,8663	101,9577	0,101768	1058,076	106,0179	0,100199	1100,896	107,9935	0,098096	1143,716	109,9756	0,096156
<b>RE</b>	806,7313	33,78278	0,041876	846,39531	34,61553	0,040898	902,9047	34,796879	0,038539	919,6174	33,91784	0,036883	938,2089	36,93548	0,039368
<b>D</b>	1090,488	37,43599	0,03433	1124,7571	37,40722	0,033258	1173,878	36,423196	0,031028	1208,194	35,68552	0,029536	1242,509	35,32397	0,02843
<b>DB</b>	765,6662	35,37404	0,0462	806,12954	34,37082	0,042637	862,2396	33,518677	0,038874	879,3478	47,71797	0,054265	906,7407	49,68027	0,05479
<b>DC</b>	976,2506	84,50546	0,086561	1008,1217	84,42683	0,083747	1056,544	84,223811	0,079716	1064,06	75,0734	0,070554	1102,331	77,31776	0,07014
<b>DR</b>	1168,185	117,1833	0,100312	1188,9662	120,7304	0,101542	1219,617	126,54771	0,10376	1219,419	130,5875	0,10709	1287,358	203,5321	0,158101
<b>DJ</b>	627,7178	73,56911	0,117201	654,19382	68,30309	0,104408	689,3375	62,314579	0,090398	710,698	65,7963	0,09258	732,0586	69,32536	0,094699
<b>DE</b>	969,6675	216,9581	0,223745	989,44956	219,7424	0,222085	1020,001	229,03006	0,224539	1054,81	229,372	0,217453	1089,62	230,0949	0,21117
<b>O</b>	633,5809	122,9619	0,194074	668,64914	112,2988	0,167949	706,189	104,90312	0,148548	736,7464	105,3166	0,142948	767,3038	106,0311	0,138187
<b>OB</b>	1026,957	137,4249	0,133818	1052,634	138,6817	0,131747	1091,272	138,12919	0,126576	1121,038	136,4402	0,121709	1150,805	134,8451	0,117175
<b>OC</b>	838,6988	128,9781	0,153784	868,07221	133,174	0,153414	911,0034	135,1395	0,148341	944,8242	154,3585	0,163373	973,0083	154,4916	0,158777
<b>OR</b>	981,9599	98,50331	0,100313	997,54574	101,221	0,10147	1021,507	104,55438	0,102353	1048,702	104,9346	0,100061	1075,898	105,3187	0,097889
<b>OJ</b>	789,4878	109,883	0,139183	812,26715	114,6739	0,141178	845,414	124,2216	0,146936	866,5768	129,008	0,148871	896,3431	138,7017	0,154742
<b>OE</b>	885,1121	64,49538	0,072867	907,49185	63,62492	0,070111	938,4422	66,514542	0,070878	962,5717	62,50328	0,064934	986,7012	58,59653	0,059386
<b>L</b>	897,4926	54,95297	0,061229	918,37363	54,78808	0,059658	946,9279	55,610608	0,058727	907,8658	70,78683	0,077971	933,5775	72,17047	0,077305
<b>LB</b>	589,1093	45,66889	0,077522	615,78515	45,10307	0,073245	651,7275	42,428275	0,065101	663,1989	66,71642	0,100598	693,3608	67,90864	0,097941
<b>LC</b>	718,9704	67,5335	0,093931	740,55082	67,77146	0,091515	770,5028	65,358909	0,084826	758,6358	63,71078	0,083981	789,5888	62,58473	0,079262
<b>LR</b>	952,4214	129,3856	0,135849	977,59861	131,5231	0,134537	1010,945	137,71145	0,13622	1045,557	142,7551	0,136535	1080,169	147,8008	0,136831
<b>LJ</b>	632,5184	162,5262	0,256951	657,49576	163,8203	0,249158	690,3431	164,48989	0,238273	723,4717	165,6981	0,229032	756,6003	166,9168	0,220614
<b>LE</b>	741,3745	107,5321	0,145044	769,0494	108,1831	0,140671	805,2913	109,79769	0,136345	812,9059	104,0285	0,127971	836,2443	99,94055	0,119511

**ANEXO C**

Tabela 12 – Tabelas de ANOVA a 5% de significância comparando as diversas interações.

**Compara os 4 resíduos**

Efeito	SS	Graus de liberdade	MS	F	p
O&G	3,63E+04	3	1,21E+04	463	0,00*
CO2	1,50E+08	3	5,00E+07	99,03	0,00*

**O&G**

Efeito	SS	Graus de liberdade	MS	F	p
Resíduo	2140	3	713,2	3396	0,000*
Inoculante	823	5	164,6	784	0,000*
Resíduo*Inoculante	69	15	4,6	22	,000*

**CO2**

Efeito	SS	Graus de liberdade	MS	F	p
Resíduo	1,08E+07	3	3,59E+06	4,64E+04	0,00*
Inoculante	1,55E+06	5	3,10E+05	4017	0,00*
Resíduo*Inoculante	6,86E+05	15	4,57E+04	591	0,00*

## ANEXO D

Tabela 13 – Remoção de O&G ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de substrato) aos 30 dias, nos diversos tratamentos realizados com os resíduos oleosos e grupos definidos pelo teste F. Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

Inóculo	Grupos formados para a conc. de O&G da espuma do R.U.				
	a	B	c	d	E
lipase	164,33				
cepa "R1"		213,33			
cepa "C1"		224,33	224,33		
cepa "B1"			236,67		
cepa "J"				250,33	
controle					286,00
Sig.	1,000	,132	,077	1,000	1,000

Inóculo	Grupos formados para a conc. de O&G da espuma da ETE				
	a	b	c	d	E
lipase	51,67				
cepa "C1"		76,67			
cepa "B1"		85,33	85,33		
cepa "R1"			93,33	93,33	
cepa "J"				103,00	
controle					121,00
Sig.	1,000	,165	,223	,102	1,000

Inóculo	Grupos formados para a conc. de O&G do lodo-UASB				
	a	b	c	d	E
lipase	124,67				
cepa "C1"		143,33			
cepa "B1"			172,33		
cepa "R1"			181,0000		
cepa "J"				196,33	
controle					229,67
Sig.	1,000	1,000	,107	1,000	1,000

Inóculo	Grupos formados para a conc. de O&G do óleo de fritura				
	a	b	c	d	E
lipase	125,33				
cepa "C1"		200,33			
cepa "B1"			219,67		
cepa "R1"			229,00	229,00	
cepa "J"				240,33	
controle					266,00
Sig.	1,000	1,000	,360	,193	1,000

